Analytix

Issue 3, Issue 4, Issue 5 • 2012, Issue 1 • 2013

Fluka Analytical

Riedel-de Haën®

Double Accreditation within Sigma-Aldrich®

Editorial

Double Accreditation within Sigma-Aldrich®

Michael Weber
Manager Marketing and R&D
Analytical Standards and Reagents

Dear Colleagues,
1875年に17カ国の代表によって「メートル条約」が締結され、1960年には「国際単位系」(SI) が導入されました。しかし、はじめて化学計測の基礎が作られたのは、1971年に7番目のSI基本単位として「モル」が導入されてからのことでした。

やがて、世界的な度量衡組織が、物質量諮問委員会 (CCQM) の傘下で設立され、各国の国立計量標準研究機関 (NMIs) が様々な分析用標準物質の開発に着手するとともに、それらの分析測定能力を比較しています。

各国の分析結果の「同等性」の評価データを得るため、NMIsは、「基幹国際比較 (Key comparison)」として知られている比較試験をまとめています。
基幹比較は度量衡で最も高いステージの技術試験で、NMIsだけが参加することを許されます。
しかしながら、時として、この比較試験に産業界からNMIs以外の参加者が招かれる事があります。その場合、NMIsではない参加者のデータが国の代表の値と見なされることはありません。
シグマ アルドリッチ (スイス) は、こうした計量比較の1つに参加する機会を得て、優れた分析専門技術を実証することができました。

もちろん、相互比較試験の全ての結果は、その時々の結果です。しかし、認証標準物質 (CRM) の製造業者にとって、測定結果の品質が常に等しく高水準であることは極めて重要です。CRM製造業者における度量衡の最高水準は、「ゴールドスタンダード」とも呼ばれる、ISO/IEC17025およびISOガイド34のダブル認定です。表紙の写真ーキログラム原器 (スイスの複製*) ーは、「変わらない高品質」の概念を正確に表しています。

Kind regards,

Michael Weber

Michael Weber
Manager Marketing and R&D
Analytical Standards and Reagents
michael.weber@sial.com

* With kind permission from Swiss Federal Institute of Metrology (METAS)

Analytix is published five times per year by Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
MarCom Europe, Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs SG, Switzerland
Publisher: Sigma-Aldrich Marketing Communications Europe
Publication: Michael Jeitziner
Editor: Isabell Davies-Falch

Feature Article

Standards

Chromatography

Spectroscopy

Titration

ISO/IEC 17025 + ISO Guide 34 認定と認証標準物質：ゴールドスタンダード

Alan Nichols, Manager R&D and Marketing alan.nichols@sial.com

分析・測定は様々な変数に左右されます。
ほとんどの場合、データの品質は、測定機器を校正するために用いる標準物質によって決まります。高品質な標準物質は、品質システムを持つ組織からのみ供給され、認定マークを適切に使用・表示することで、正規の認証標準物質を使用していることが保証されます。

高品質な標準物質は従来、米国国立標準技術研究所（NIST）やその他の国家計量標準研究機関（NMI）から供給されていました。しかし、これらの供給元の標準物質は入手が困難なことが多く、価格も比較的高めでした。

1970年代後半から1980年代初頭には、手頃な価格で信頼できる標準物質へのニーズやラインアップの要望の高まりに応えて、市販標準物質の供給業者が激増しました。しかし、品質と一貫性のばらつきが大きく、ISO9001標準規格を広く採用することによって、この問題に対処する本格的な取り組みが始まりました。この標準規格（ISO9001）により、基本的な品質システムの枠組みとビジネスシステムを実行する基準が設けられたものの、計量学に適用可能な、度量衡のしっかりした標準規格、という点ではほとんど利益をもたらしませんでした。この問題に対処するために、標準物質と認証標準物質（CRM）に焦点を当てたISOガイド（30～35）のシリーズと、校正と検定に焦点を当てたISO/IEC17025標準規格が開発されました。

ISO/IEC17025は、研究施設に校正および／または検定の能力があることを表し、また、ISOガイド34の要求事項に従っていることは、標準物質製造業者に適切な能力があることを表します。しかし、単にこれらの標準規格に従って運営しているだけでは、信頼できる品質システムがあることにはなりません。組織の品質システムを徹底的に調べたこと、および標準規格の必要条件が満たされていることを実証する客観的証拠を調べたことについて、第三者認定により保証されます。認定を受けた組織は、その組織が発行する印刷物（一般的には分析証明書）に認定機関の認定マークを表示します。ISO/IEC 17025とISOガイド34双方の認定を受けていることは、度量衡の業績の最高水準を表す「ダブル認定」と呼ばれます。すなわち、ゴールドスタンダードです。ダブル認定により、組織は正式に認証標準物質を生産できるようになります。**Figure 1**は認定マークを示しています。

Figure 1 ISO/IEC 17025 and ISO Guide 34 Marks from the Swiss Accreditation Service (SAS) and the US ANSI-ASQ National Accreditation Board (ACLASS). Both SAS and ACLASS accreditation certificates are accepted worldwide.

認定で重要なのは適用範囲です。認定の適用範囲は、組織が実行および生産できる認証標準物質の検定、技術、方法、種類のリストです。組織の範囲外で生産され、検定を受けた標準物質は正規の認証標準物質とは呼べず、認定マークは関連する正規の分析証明書に記載されない可能性があります。実際に ISO 標準規格では、範囲外の全ての検定・標準物質を明確に区別するよう義務づけています。

Brand	Location	ISO/IEC17025	ISO Guide 34
Fluka®	Buchs, Switzerland	★	★
Supelco®	Bellefonte, PA	★	★
Sigma-Aldrich® RTC	Laramie, WY	★	★
Cerilliant	Round Rock, TX	★	★

Table 1 Sigma-Aldrich has four sites which are doubly accredited and are producing certified reference materials.

適用範囲は常に容易に確認・再考することができます。各認定機関は、認定した組織とそれらの関連する範囲のリストをウェブサイト上に掲載しており、また多くの認定された組織も、それぞれのウェブサイトに範囲について掲載しています。シグマアルドリッチは、すべての重要な分析技術を使用しテストするため、qNMR、ICP-AES、HPLC（複数の検出器）、GC（複数の検出器）、MS などを含み、これらに限らずに ISO/IEC17025 の下で認定を受けています。

また、ISO ガイド 34 の下でも認定を受けており、環境分析、医薬品分析、食品分析、石油化学分析などにとどまらず、多岐にわたる分析法に利用可能な認証標準物質を未希釈品および定量溶液の形で生産しています。次のリストは、最近発売された CRM を示しています。Cerilliant® ブランド製品の製品概要については、sigma-aldrich.com/crm または cerilliant.com をご覧ください。

Cat. no.	Brand	Description	Package size
CRM48392	Supelco	Triazine Pesticide Standard, ***Trace*CERT**®, 100 µg/mL each component in methanol Ametryn, atrazine, prometon, prometryn, propazine, simazine, terbutryn	1 mL
CRM7505	Supelco	HC BTEX/MTBE, ***Trace*CERT**, 2000 µg/mL each component n methanol Benzene, toluene, ethylbenzene, o-, m-, & p-xylene, methyl tert-butyl ether	1 mL
CRM47177	Supelco	Formaldehyde-DNPH, ***Trace*CERT**, 100 µg/mL in acetonitrile	1 mL
CRM48902	Supelco	EPA 8270 semi-volatile internal standard mix, ***Trace*CERT**, 2000 µg/mL each component 2 mL in methylene chloride Acenaphthene-d_{10}, chrysene-d_{12}, 1,4-dichlorobenzene-d_4, naphthalene-d_8, perylene-d_{12}, phenanthrene-d_{10}	
CRM40071	Supelco	Benzo(a)pyrene, ***Trace*CERT**, 1000 µg/mL each component in acetonitrile	1 mL
42438	Fluka	Benzyl butyl phthalate, ***Trace*CERT**	50 mg
69311	Fluka	Chinine, ***Trace*CERT**	50 mg
43540	Fluka	Diisobutyl phthalate, ***Trace*CERT**	100 mg
51791	Fluka	Acetate standard for IC, ***Trace*CERT**, 1000 mg/L acetate in water	100 mL
42071	Fluka	Manganese standard for ICP, ***Trace*CERT**, 10 g/L manganese in 5% nitric acid	100 mL
83787	Fluka	Rhenium standard for AAS, ***Trace*CERT**, 1 g/L rhenium in 2% nitric acid	100 mL
PHR1238	RTC	Ergocalciferol (vitamin D_2)	500 mg
PHR1185	RTC	Amlodipine besylate	1 g
PHR1196	RTC	Nitrofurazone (nitrofural)	1 g
PHR1235	RTC	Retinyl palmitate (vitamin A palmitate)	1 g
PHR1178	RTC	Budesonide	500 mg
B-050	Cerilliant	Buphedrone ephedrine metabolite HCl, 1.0 mg/mL (as free base) in methanol	1 mL
T-077	Cerilliant	3,3′,5-Triiodo-L-thryonine-$^{13}C_6$ (T3-$^{13}C_6$), 100 µg/mL in 0.1N NH3 in methanol	1 mL
A-096	Cerilliant	Aldosterone, 100 µg/mL in acetonitrile	1 mL
Z-009	Cerilliant	Zoplicone N-oxide, 100 µg/mL in methanol	1 mL
G-015	Cerilliant	Ginseng ginosides mix, 100 µg/mL of each component in methanol	1 mL

Table 2 Recent certified reference materials released by Sigma-Aldrich

度量衡の最高レベルの測定能力

シグマ アルドリッチが国際ラウンドロビンテストで優れた結果をおさめました

Jürg Wüthrich, Senior Scientist R&D juerg.wuethrich@sial.com
Markus Pfluger, Supervisor Quality Control markus.pfluger@sial.com
Klaus-Dieter Schmidt, Senior Supervisor Quality Control klaus-dieter.schmidt@sial.com

「メートル条約」が17カ国の代表者によって1875年5月20日にパリで調印され、国際的な度量衡とメートル法の発展の調整を目的とする機関が設立されました。当初は質量と長さの単位にのみ関心が持たれていましたが、1921年に改正が行われ、その権限が物理的測定全体をカバーするまで広がりました。1960年以来、それは「国際単位系」(SI) として知られるようになりました。

世界中の度量衡の標準化を容易にするために、メートル条約により3つの主な組織が作られました。1つ目のCGPM (国際度量衡総会) は加盟国の代表者にフォーラムを提供します。2つ目のCIPM (国際度量衡委員会) は地位の高い計量学者の諮問委員会です。そして、3つ目のBIPM (国際度量衡局、拠点はセーヴル (フランス)) は、GCPMとCIPMが支持して適切な事務局および研究施設を提供する研究機関です。

1889年以来、質量の単位 (キログラム) は国際キログラム原器 (IPK) の質量と定義されて、BIPMの3重のベルジャーの中に保管されています (図を参照)。このシリンダーは、90%のプラチナと10%のイリジウムの合金でできています。IPKと公式の複製との (約40年ごとの) 3回の比較の間にIPKの質量が50 μg (1年に約0.5 μg！) 変化したことが判明しました。その結果、2011年にはキログラムの再定義が提案されました。2014年に開催される次回CGPM会議において、その歴史が変更される可能性が高くなっています。この例は、科学界で国際的な基幹比較が非常に重要であること示しています。

諮問委員会と基幹比較

長年にわたり、CIPMは特定の分野の専門家を科学的および技術的問題に関するアドバイザーとして世界中から招集し、数多くの諮問委員会を設置してきました。CCQM (物質量諮問委員会ー化学計測) は、一次分析法、国際比較、国立研究施設間の国際的な等価性の確立、および化学分野の度量衡問題への助言に関わる活動を行っています。これらのCCQM基幹比較に参加できるのは、加盟国の研究施設 (通常、国家計量標準研究機関 (NMI) の研究施設) に限られます。NMIの基幹比較の結果は多くの場合、その国の校正および測定能力に相当します。

Participant	Technique
BAM – Federal Institute for Materials Research and Testing, Germany	MC-TIMS, double IDMS
CENAM – Centro Nacional de Metrología, Mexico	ICP-OES, one-point-calibration + IS
GUM – Central Office of Measures, Poland	ICP-OES, one-point-calibration
HKGL – Government Laboratory, Hong Kong	ICP-OES, one-point-calibration + IS
INM – National Institute of Metrology, Romania	Q-ICP-MS, calibration curve
INMETRO – National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality, Brazil	ICP-OES, calibration curve
INTI – Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Argentina	FAAS and ICP-OES, one-point-calibration
KRISS – Korea Research Institute of Standards and Science	ICP OES, one-point-calibration + IS
LGC – LGC Ltd., United Kingdom	MC-ICP-MS, double IDMS and Q-ICP-MS, one-point-calibration + IS
LNE – Laboratoire National de Métrologie et d'Essais, France	Q-ICP-MS, double IDMS and titrimetry
NIM – National Institute of Metrology, P. R. China	Q-ICP-MS, bracketing + IS
NIST – National Institute of Standards and Technology, USA	ICP-OES, one-point-calibration + IS
NMIA – National Measurement Institute, Australia	HR-ICP-MS, double IDMS
NMIJ – National Metrology Institute of Japan	titrimetry
NMISA – National Metrology Institute of South Africa	ICP-OES, bracketing + IS
PTB – Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Germany	ICP-OES, bracketing + IS
SMU – Slovak Institute of Metrology	coulometric titrimetry and titrimetry
TUBITAK UME – TUBITAK National Metrology Institute, Turkey	Q-ICP-MS, four-point-calibration + IS and Q-ICP-MS, double IDMS
VNIIM – D. I. Mendeleev Institute for Metrology, Russian Federation	ICP-OES, one-point-calibration

Table 1 Participants of CCQM-K87 in alphabetical order of their acronyms and technique used for measurements

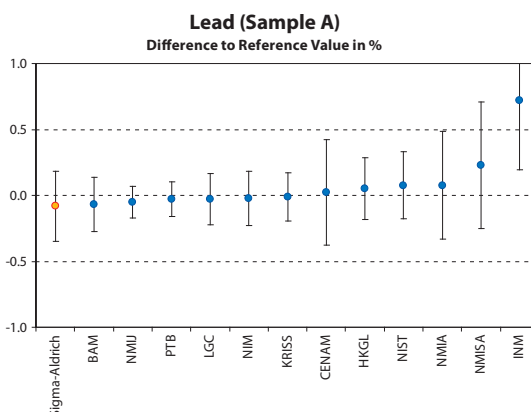
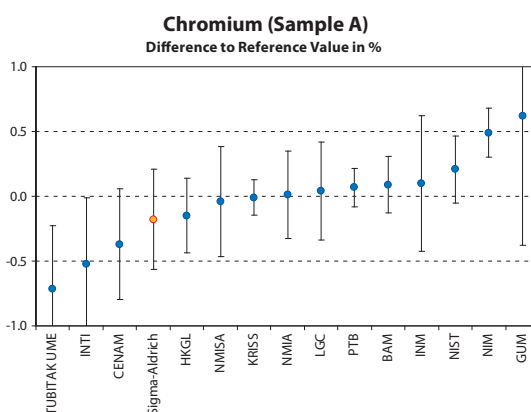
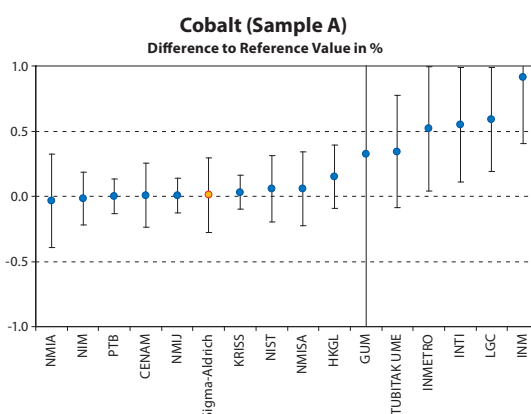
CCQM-K87：Cr、Co および Pb の校正溶液

基幹比較 CCQM-K87 と、それに関係のあるパイロットスタディー CCQM-P124 の両者で、同一形式の試料を測定しました。様々なマトリックスフリーで単元素の標準溶液は、PTB のパイロット研究施設がおよそ 1g/kg の質量含有率で調製しました。様々な種類のニーズと課題を代表して 3 種類の元素（クロム、コバルトと鉛）が選ばれました。クロムは環境分析でますます重要になっています。コバルトはモノ同位元素なので、同位体希釈法を使って定量することができません。鉛は天然での組成に幅があるため、通常、試料ごとに同位体存在度を定量する必要があります。

結果

シグマ アルドリッチ（スイス）は標準物質の製造業者として定評があることから、パイロットスタディーへの参加を要請されました。参加の機会があったのは一握りの民間研究施設であり、この国際比較に参加できたことは非常に名誉なことでした。

図は、基幹比較の結果（基準値± 1%）を抜粋して、シグマ アルドリッチが高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-OES）で測定した結果と併せて示しています。ICP-OES の校正は、内部標準（IS）での校正とひとまとめにして、ワンポイントで行いました。全部で 6 つの試料（Co、Cr と Pb のそれぞれ試料 A と B）について、0.13% ～ 0.36%の不確かさで拡張測定を行いました。試料 B と C については、コバルト元素および鉛元素の滴定結果についても報告しました。両技術による結果は、正確に一致し（わずか 0.03%と 0.06%の差）、基準値とも非常に良く一致しました。CCQM 報告の原文のコメントに記載されているように、シグマ アルドリッチの測定結果は様々な NMI の最良の結果に匹敵しました（下記のテキストボックスを参照）。全ての詳細と結果は、Metrologia, 2012, 49, Tech. Suppl., 08010 CCQM-K87 Final Report, 2012, P104（www.bipm.org/utils/common/pdf/final_reports/QM/K87/CCQM-K87.pdf）に公表されています。パイロットスタディー CCQM-P124 の結果は、Appendix C に記載されており、その中でシグマ アルドリッチは「Industry-2」と呼ばれています。

2007 年以来、シグマ アルドリッチ（スイス）は、ダブル認定（ISO ガイド 34 と ISO/IEC17025）の下で、*Trace*CERT® ブランド（sigma-aldrich.com/tracecert）として認証標準物質を製造しています。この国際比較に示されるように、シグマ アルドリッチの優れた測定能力により、お客様にはスタンダードを信頼してご使用いただけます。

“平行して行われたパイロットスタディー CCQM-P124 により、少なくとも参加した 2 つの業界研究施設（どちらも二次校正溶液の供給業者の研究施設）が NMI の大半と同等に、単元素の校正溶液を正しく測定できることが証明されました。現場のトレーサビリティーは、参加した製造業者のような業者から二次校正溶液を調達して行われるので、このことは励みになる発表です”

有機認証標準物質の定量 NMR のテクニック

Dr. Christine Hellriegel, Senior Scientist R&D Europe christine.hellriegel@sial.com
Dr. Alexander Rück, Senior Scientist R&D Europe alexander.rueck@sial.com

約 2 年前、シグマ アルドリッチは、ISO/IEC17025 と ISO ガイド 34 のダブル認定に基づき、^{1}H-qNMR によって定量された認証標準物質 (CRM) の製品群を発売しました。この製品群はトレーサブルな認証標準物質という意味で *Trace*CERT® と名づけられました [1]。現在では、約 90 のクロマトグラフィー用標準物質と、11 の qNMR 用標準物質の CRM があります。最新の製品リストは、sigma-aldrich.com/organiccrm のウェブサイトに掲載されています。

qNMR 技術は様々な産業への応用に向けて関心が高まっています。定量的 NMR 分光法を実施するためのシグマ アルドリッチのプロトコールをご紹介いたします [2]。

クロマトグラフィーでの純度測定における主な課題とは？

通常、有機物質の純度は HPLC または GC で測定します。クロマトグラフィーでの純度は検出されたすべてのシグナルの面積%に相当します。この手法では、物質が異なれば強度も異なる場合があり、さらに、不純物が検出器に到達しない、あるいは検出されない可能性もあるため、クロマトグラフィーの純度は真の含有率と大きく異なる場合があります。仮に、物質に 10%の塩または溶媒が含まれていたらどうなるでしょうか。その場合、その物質の真の含有率は約 90%ですが、クロマトグラフィーでは 99%超の純度にみえます。この問題は、同一物質の純粋なスタンダードを同じクロマトグラムで実行することで解決できます。このように、一度スタンダードの純度と秤量値が確立されると、試料物質から標準物質および SI 単位系までのトレーサービリティチェーンを構築することができます。ただし、有機化合物は無数にあるため、多くの場合、本当に適切なクロマトグラフィー用スタンダードを見つけることは困難です。

qNMR を使う利点とは？

qNMR の技術を用いると、1 回の実験で定量的かつ定性的な情報が得られます。NMR 分光法そのものは非侵襲かつ非破壊的な方法であり、混合物中から分析対象化合物を事前に単離することなく、目的物質の定量的情報を得ることができます。qNMR では、内部標準または外部標準を使用し、分析します。精度の高さから内部標準の方が好んで用いられるため、この方法についてさらに説明します。他にも qNMR には他の分析方法と比較して試料の調製が非常に簡単です。

試料と標準物質は同じバイアルに入れて直接秤量します。得られる NMR スペクトルで、試料と標準物質のプロトンシグナルの強度を比較します。qNMR は相対的一次法で、シグナル強度が共鳴に貢献しているプロトンの数に正比例することを意味します [3]。さらにまた、目的とする試料と標準物質のシグナル強度を直接比較することができ、得られる含量は真の含量です。

qNMR 測定を成功させる重要なステップ

1) 適切なリファレンススタンダードの選択

qNMR 標準物質は、高純度であることに加えて、吸湿性または揮発性ではない秤量が簡単にできる物質であることが重要です。
水分は ^{1}H-NMR スペクトルのベースラインに影響を及ぼし、その結果、積分誤差を生じる可能性があるため、残留しないようにすべきです。また、重水素化溶媒への溶解度および化学シフトも中心的な役割を果たします。試料のシグナルとの重複を最小にするために、標準物質のシグナルは少なくなければなりません。試料が異なれば、別の標準が必要になりますが、スペクトルの中で各シグナルから十分に離れたシグナルが 1 つあれば十分です。正確で精密な qNMR 測定を保証するためには、1:1 のシグナル強度比が必要です。
プロトンを持つ限り、標準物質は全く異なる有機物質になりえます。例えば国立標準技術研究所 (NIST) から入手したような国際的に認められた標準物質を使う場合など、その物質について十分に同定可能な時には、直接的なトレーサービリティチェーンを確立できる場合があります。

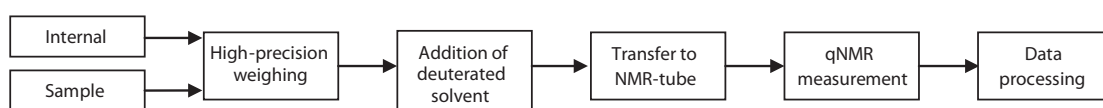



Figure 1 Important steps to successful qNMR measurements

2) 適合性のチェック
qNMR 標準物質は、試料または溶媒と反応しないように、化学的に安定または不活性でなければなりません。さらに、^{1}H-NMR 実験に適合するものか、チェックすることをおすすめします。シグマ アルドリッチでは、1 つの試料の分析対象物と標準物質の間の耐性を、t = 0 と t = 24h の継続実験によって測定しています。定量化における関連シグナルは互いに重なり合ったり、不純物に干渉されたりしてはいけません。最良の内部標準を見つけるために、様々な組み合わせを試すことが必要になります。

3) 高精度の秤量

結果に直接影響するため、優れた秤量値は必須です。シグマ アルドリッチ（スイス）では、DKD により保証され、OIML クラス E2 の分銅で校正された、最小表示が 100ng の METTLER TOLEDO 製 UMT-5 ウルトラミクロ天秤を使用しています。天秤を完全に石製の台盤上に設置し、静電気の可能性を除去するために、U- 電極を所定の位置に置きます。試料と標準物質を同じ HPLC- バイアルに入れて秤量します。バイアルは重水素化溶媒による溶媒和のために密閉されます。確実に溶解させるためには超音波処理が必要です。

4) 機器設定を決める

シグマ アルドリッチ（スイス）では、5mm の BBO プローブヘッドを搭載した 600MHz の Bruker Avance-III 核磁気共鳴分光計を使用しています。また、S/N 比を改善しアーチファクトを減らすために、90° パルスを加え、通常、T1 の 5 ～ 7 倍待ちます。混合物と重水素化溶媒によって T1 緩和時間が変わるため、適合性チェックと同時に各混合物の緩和時間を評価します。

5) スペクトルの評価
FID にゼロ充填と指数関数的な重み付けをした後、フーリエ変換が行われます。スペクトル処理では、位相補正とベースライン補正の 2 つが重要です。正確な積分値を得るために、自動処置に頼らずに、手動でこの処理を行います。統合化の際に、両シグナルに ^{13}C サテライトを含めるか、除外するかということが重要です。このことは、シグナルのまわりの空間に依存します。

6) 絶対含量の算出
5 ～ 10 回積算することをおすすめします。次の方程式によれば、試料含量の定量化は、^{1}H-NMR ピーク面積、および候補物質と標準物質の最初の重量から直接計算されます。

$$P_{Sample} = \frac{I_{Sample}}{I_{Ref}} \cdot \frac{N_{Ref}}{N_{Sample}} \cdot \frac{M_{Sample}}{M_{Ref}} \cdot \frac{m_{Ref}}{m_{Sample}} \cdot P_{Ref}$$

さらに正確な結果を得るために、研究室の環境条件がわかっているならば、秤量値を空気の浮力で修正することができます。

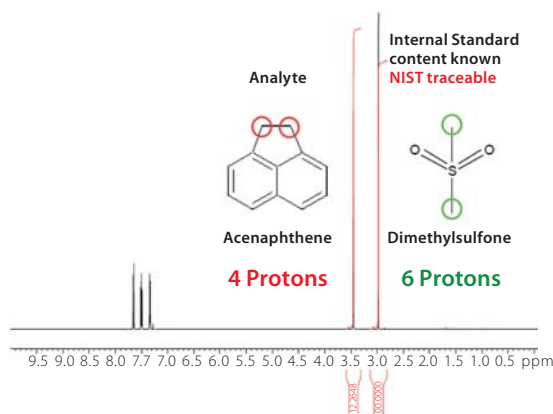



Figure 2 qNMR Spectrum of Acenaphthene and CRM Dimethylsulfone

P_{Sample}	Purity of sample as mass fraction (Acenaphthene, in % g/g)
P_{Ref}	Purity of reference as mass fraction (Dimethylsulfone, in % g/g)
I_{Sample}	Integral of the sample signal (Acenaphthene = 112.2648)
I_{Ref}	Integral of the reference signal (Dimethylsulfone = 100.0000)
N_{Sample}	Number of sample protons (Acenaphthene = 4)
N_{Ref}	Number of reference protons (Dimethylsulfone = 6)
M_{Sample}	Molecular mass of the sample (Acenaphthene = 154.21)
M_{Ref}	Molecular mass of the reference (Dimethylsulfone = 94.13)
m_{Sample}	Mass of sample (Acenaphthene)
m_{Ref}	Mass of reference (Maleic acid)

7) 不確かさの評価
異なる 2 つのプロトンのシグナル比を、極めて高い精度で測定することができます。ほとんどの場合、シグナルの統合化が、測定の不確かさを支配します。オペレーター間のわずかな違いを考慮に入れると、統合化のためのさらなるインクリメントが、不確かさの評価に組み入れられます。
バルク原料全体の異なる部分から 7 ～ 10 の副試料を採取し、それを qNMR で測定して物質の均一性を検定します。推奨される最小の試料の大きさは、全ての均質性試験試料で採用されていて、分散分析（ANOVA）の結果を不確かさの計算に含めなければなりません [3]。

結論
標準物質製造業者には、保存温度およびそれより高い温度で安定性試験を行うことが義務づけられています。いくつかの基本ルールに従い、優れたバランスを持てば、1%の測定の不確かさで ^{1}H-NMR 測定をルーチン的に実行することができます。内部標準によってインクリメントを最小にするために、シグマアルドリッチは最適条件下で新しい CRM を認証しました。この新 CRM での、約 0.1%の不確かさが結果全体に影響を及ぼすことはないと考えられます [4]。

References
[1] Analytix No. 3 (2010), "New generation of organic CRM", pp4–6.
[2] F. Malz, H. Jancke, J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005), pp813–23.
[3] Eurachem/CITAC Guide, 2nd Ed. (2000), "Quantifying uncertainty in analytical measurement."
[4] Weber M.; BERM-13, oral presentation on High Performance qNMR (2012).

遺伝毒性化合物 スルホン酸エステルの認証標準物質

Matthias Nold matthias.nold@sial.com
Richard Detterbeck richard.detterbeck@sial.com

メタンスルホン酸（MSA）などのスルホン酸誘導体は、医薬品化学でよく用いられます。アミンを含有する医薬品物質のメシラート塩類には、高い溶解度およびバイオアベイラビリティならびにイオン効果がないなど、一般的に用いられる塩酸塩類に勝る利点があります［1］。

しかし、溶媒としてメタノールまたはエタノールを用いた結晶化と再結晶化の過程から生じる副生成物や、出発原料となる MSA の不純物として、微量なアルキルスルホン酸エステルが混入するという深刻な懸念があります。これらのスルホン酸エステルには、遺伝毒性と発がん性への影響があることが知られています［2］。

したがって、最終的な医薬品だけでなく、塩を生成させるために出発原料として使われたアルキルスルホン酸についても、これらの化合物が存在しないか、注意深く確認しなければなりません。

新製品の SAFC Pharma® グレード製品ラインは、医薬品製造で使用するための、GMP に準拠したビルディングブロックや溶媒を提供します（sigma-aldrich.com/pharmagrade）。これらの製品の品質管理を支援するために、メタンスルホン酸とエタンスルホン酸のメチルエステルとエチルエステル、ならびに L-メチオニンスルホキシイミンとラウリン酸メチルなどの *Trace*CERT® 有機 CRMs が開発されました。

メタンスルホン酸 Pharma グレードの仕様書には、メタンスルホン酸メチルだけでなくメタンスルホン酸エチルが ≤ 5 ppm（GC）であることも記載されています。この GC 測定に、*Trace*CERT CRMs が使われています。シグマアルドリッチが内部精度管理のために用いている CRMs は、*Trace*CERT のカタログ製品としてお客様にもご購入いただけます。

有機 *Trace*CERT 製品は、NIST SRM に直接トレーサブルで、ISO/IEC 17025 と ISOGuide 34 に従って製造される高品質の認証標準物質（CRMs）です。トレーサビリティは、相対的一次法として高性能定量 NMR（HP-qNMR®）を用いて達成されます。この方法の大きな利点は、大部分の分析手法とは異なり、積分値のシグナルが化合物の構造に依存していないということです。したがって、異なる化合物を高精度で定量的に比較することができます。有機 *Trace*CERT の認証についての概念は、詳細な

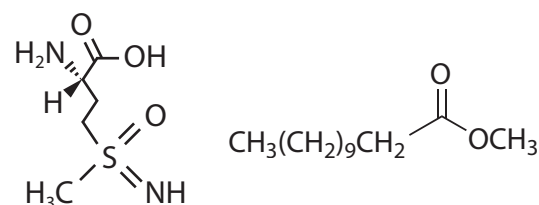



Figure 1 Chemical structure of L-Methionine sulfoximine and methyl laurate

技術文献が既刊の Analytix に掲載されています［3］。

現在、アミノ酸、天然物、多環芳香族炭化水素、脂肪酸／脂肪酸メチルエステル、農薬から医薬品まで、約 100 種類の有機 *Trace*CERT 製品がご利用いただけます。**Table 1** は、最近追加された、SAFC Pharma グレードの品質管理に関連する製品です。最新の全製品リストは技術資料と証明書の例と共にウェブサイト（sigma-aldrich.com/organiccrm）でご覧いただけます。

Cat. No.	Brand	Product	Package Size
30934	Fluka®	Ethyl ethanesulfonate	120 mg
72945	Fluka	Ethyl methanesulfonate	120 mg
50490	Fluka	Methyl ethanesulfonate	120 mg
78697	Fluka	Methyl methanesulfonate	120 mg
91016	Fluka	L-Methionine sulfoximine	100 mg
07041	Fluka	Methyl laurate	100 mg

Table 1 *Trace*CERT Organic CRMs

Cat. No.	Brand	Product	Package Size
11317	Sigma-Aldrich	Methanesulfonic Acid	1 kg
76078	Sigma-Aldrich	L-Methionine sulfoximine	1 g; 5 g
39937	Sigma-Aldrich	Methyl Laurate	250 g

Table 2 Examples of SAFC Pharma Grade Products (GMP)

References

[1] Snodin D.J; *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* 45 (2006); 79–90.

[2] Eder E; Kutt W; Deindinger C; *Annals Chem. Biol. Interact.* 137 (2001), 89–99.

[3] Analytix 03/2010; 01/2011; 03/2011; 04/2011; 01/2012.

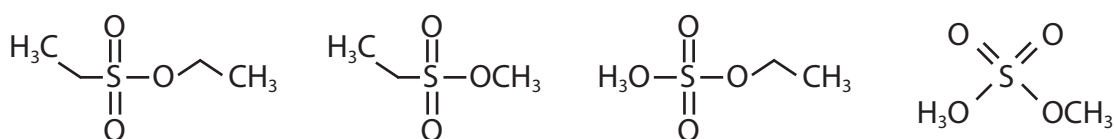



Figure 2 Chemical structures of the sulfonic acid esters

USP <232> および <233> のための新しい認証標準物質

校正と品質管理用の 2 つの多元素標準溶液

Jürg Wüthrich, Senior Scientist R&D juerg.wuethrich@sial.com

1 世紀以上の間、医薬品中の金属不純物は、米国薬局方（USP）General Chapter <231> *Heavy Metals* で、不溶性の金属硫化物の沈殿に基づく比色試験に従って、パラメータの合計として測定されていました。

現在、USP は元素の不純物に関連した新しい General Chapters <232> *ELEMENTAL IMPURITIES-LIMITS*、および <233> *ELEMENTAL IMPURITIES-PROCEDURES*、の 2 つを導入しています。これらは、製剤中の 16 の選定された不純物を、現代の分析法（ICP-OES および ICP-MS）に基づいて検出するメソッドで、毒性データと曝露水準に基づく許容限度値に基づいて規定しています。この新しいメソッドは、人々の暴露のより安全な限度を設定し、従来の方法の環境影響を減らすように設計されています。規格は 2012 年 12 月 1 日に収載され、規格適合性は 2014 年 5 月 1 日に要求されます。

新旧 USP 手法の比較

USP <231>（重金属）の欠点：この古く非特異的で半定量的な方法では、硫化物イオンで沈殿する金属（Ag、As、Bi、Cu、Cd、Hg、Mo、Pb、Sb および Sn）しか検出できないこと。労力がかかること。試料のサイズが比較的大きいこと（1 ～ 2 g）。偽陰性の結果が得られる場合があること（特に Hg において）。Sn、Pt、Cr および Ni などの他の関連する分析対象物に関する情報が得られないこと。

USP <232> および <233>（許容限度値および分析手法の提案）の利点：最新の試料調製方法で大部分の固体物質が完全溶解（密閉容器またはマイクロ波分解）されること。検出限界が改善されたため試料のサイズが小さいこと。ICP-OES および ICP-MS の多元素分析で効率が向上し、分析費用を削減できること。

Element	PDE (µg/day)
Inorganic Arsenic	1.5
Lead	5
Inorganic Mercury	15
Cadmium	25
Molybdenum	100
Palladium	100
Platinum	100
Vanadium	100
Iridium	100
Osmium	100
Rhodium	100
Ruthenium	100
Nickel	500
Copper	1000
Chromium	(n)

Table 1 USP<232> analytes and permissible daily exposure (PDE) for pharmaceutical products as oral uptake. (n) = not a safety concern

適切な校正スタンダードの選択

管理された環境（GMP または ISO）で金属不純物分析を行う場合、校正と品質管理のために「正しい」標準物質が必要です。ISO/IEC 17025 および ISOGuide 34 に従って、USP <232> および <233> のための 2 つの新しい *Trace*CERT 認証標準物質を発売しました。この製品は、トレーサブルや、正しく計算された不確かさがあり、高品質の包装（予備洗浄した FEP ボトルに、クリーンルームで充填し、多層アルミニウムバッグに入れご提供いたします。）で提供いたします。濃度水準は、製剤の経口的および非経口的 PDE 限度のチェック用に設計されています。

Cat. no.	Product	Description
89395	USP 232 Element Impurities, Standard 1	1.5 mg/L: As 5 mg/L: Pb 15 mg/L: Hg 25 mg/L: Cd 100 mg/L: Mo, V 500 mg/L: Ni 1000 mg/L: Cu in 10% in nitric acid, 100 mL FEP bottle
39967	USP 232 Element Impurities, Standard 2	100 mg/L: Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru in 10% hydrochloric acid, 100 mL FEP bottle
02650	Nitric acid	~65%, ***Trace*SELECT**® Ultra, for ultra trace analysis, 250 mL and 1 L FEP bottles
96208	Hydrochloric acid	30%, ***Trace*SELECT** Ultra, for ultra trace analysis, 250 mL and 1 L FEP bottles
02658	Hydrofluoric acid	49%, ***Trace*SELECT** Ultra, for ultra trace analysis, 250 mL and 1 L FEP bottles
77239	Sulfuric acid	95%, ***Trace*SELECT** Ultra, for ultra trace analysis, 250 mL and 1 L FEP bottles
14211	Water	***Trace*SELECT** Ultra, ACS reagent, for ultra trace analysis, 1 L HDPE bottle

Table 2 Range of Fluka® branded products that are used with USP <233>. Please find the complete list of inorganic trace analysis products at **sigma-aldrich.com/traceanalysis**

Standards

フレーバー・フレグランスの新しいアナリティカルスタンダード

Dr. Matthias Nold, Product Manager, Analytical Standards matthias.nold@sial.com

味と香りは、食品や飲料における最も重要な特性の１つです。したがって、フレーバー・フレグランスの分析は、食品産業において品質管理と製品開発のために重要です。しかし通常、これらは、単一成分からできているのではなく、むしろ多様な構造の芳香化合物の複雑なブレンドから作られています [1]。そのため、フレーバー・フレグランスの分析は難しい作業となり、校正に適した分析法と信頼できるスタンダードが必要になります。

シグマ アルドリッチは、フレーバー・フレグランスの分析のために、芳香化合物のアナリティカルスタンダードの幅広い製品群を提供しています。最近追加された製品を以下に記載します。製品のラインアップについては sigma-aldrich.com/flavor のウェブサイトをご覧ください。

	Cat. No.	Brand	Product	Package Size
	64397	Fluka®	α-Amylcinnamaldehyde, mixture of cis and trans	100 mg
	50375	Fluka	Bis(methylthio) methane	100 mg
	53877	Fluka	2,6-Dimethoxyphenol	100 mg
	76048	Fluka	Dimethyl sulfide	100 mg
	44527	Fluka	4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2,5-dihydrofuran-2-one	100 mg
	92255	Fluka	δ-Dodecalactone	100 mg
	55821	Fluka	Ethyl 3-hydroxybutyrate	100 mg
	94185	Fluka	Ethyl maltol	100 mg
	90728	Fluka	Ethylpyrazine	100 mg
	75034	Fluka	2,3-Hexanedione	100 mg
	91316	Fluka	cis-3-Hexen-1-ol	100 mg
	53407	Fluka	5-(Hydroxymethyl) furfural	100 mg
	79467	Fluka	Linalyl formate	100 mg
	77938	Fluka	Methyl 3-hydroxyhexanoate	100 mg
	80133	Fluka	Methyl cyclopentenolone	100 mg
	69193	Fluka	Methyl nicotinate	100 mg
	62535	Fluka	Methyl p-tert-butylphenylacetate	100 mg
	61352	Fluka	4-Methyl-5-thiazoleethanol	100 mg
	18073	Fluka	2-Methylanisole	100 mg
	30761	Fluka	2-Methylbutyl acetate	100 mg
	49597	Fluka	5-Methylquinoxaline	100 mg
	44638	Fluka	3-(Methylthio) propionaldehyde	100 mg
	75041	Fluka	Neohesperidin dihydrochalcone	100 mg
	51573	Fluka	γ-Octalactone	100 mg
	76046	Fluka	Piperidine	100 mg
	94474	Fluka	Sucrose octaacetate	100 mg
	95162	Fluka	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	100 mg
	76047	Fluka	Tripropionin	100 mg

Table 1 New Analytical Standards for the Analysis of Flavors and Fragrances

Reference

[1] "Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials", Kevin Goodner, Russell Rouseff, John Wiley & Sons, 2011.

シグマ アルドリッチが提供する高純度のカプサイシン — 期待以上の高品質！

Michael Jeitziner, Market Segment Manager Analytical Reagents & Standards michael.jeitziner@sial.com

唐辛子はトウガラシ属の果実で、ヒトを含む哺乳類には刺激物で、接触するとどんな組織にも灼熱感を引き起こします。カプサイシンは、そのスパイシーな唐辛子の主要な有効成分で、香辛料のきいた様々な料理の食品添加物として、また、末梢性神経障害性疼痛の治療目的や、農薬、唐辛子スプレー、化粧品の成分などとして使われます [1, 2]。

カプサイシン（トランス-8-メチル-*N*-バニリル-6-ノネンアミド）は、脂溶性の無色、無臭のアルカロイドの結晶で、分子式は $C_{18}H_{27}NO_3$ です。カプサイシンは、シス-トランス異性体があり、(**Figure 1**) 天然に存在するカプサイシンは常にトランス型です [3]。

Z-カプサイシン（シス型）は化学合成されたカプサイシンで見られます。合成カプサイシン（ノニバミド）と混同してはいけません (**Figure 2**)。

トウガラシ属の唐辛子から単離された純粋なカプサイシンは、通常、ジヒドロカプサイシンとノルジヒドロカプサイシンなどの他のカプサイシノイドの不純物を含みます。シグマ アルドリッチは、HPLC による検定で **99.0% 以上**の純度を保証する、優れた品質の E-カプサイシンを製造し、提供しています。

References

[1] Pesticide Products. Pest-Bank [CD-ROM] 2007.
[2] Johnson Jr. Int. J. Toxicol. 2007, 26 (Suppl. 1), 3–106.
[3] De Lourdes Reyes-Escogido, Maria, et al. Molecules 2011, 16, 1253–1270; doi:10.3390/molecules16021253.

Brand	Cat. no.	Description	Assay	Pack sizes
Fluka®	12084	Capsaicin, analytical standards	≥99.0% (HPLC)	10 mg, 100 mg

Table 1 Product information

O
NH
E-Capsaicin (*trans*-form)
OCH3
OH

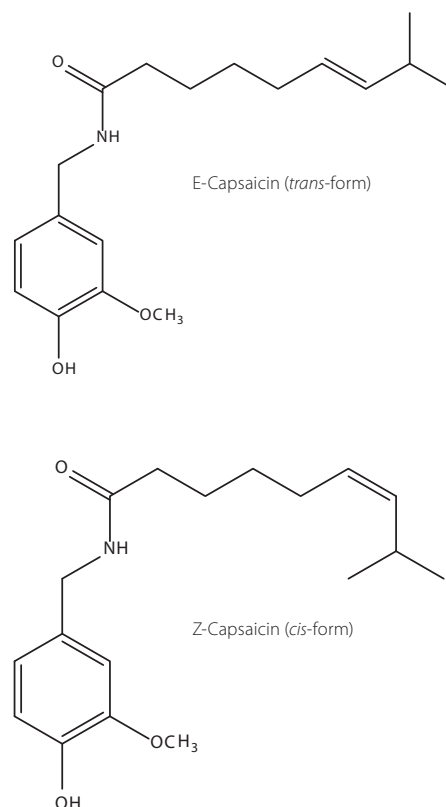



Figure 1 The structure of E- and Z-Capsaicin

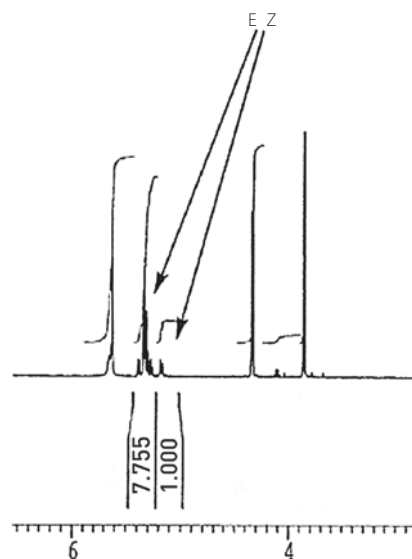



Figure 2 [1]H-NMR spectra of synthetically produced E-Capsaicin contaminated with Z-Capsaicin, Source: Syndeco GmbH, Switzerland

Standards

マイコトキシン分析を最適化するツール

新しい HPLC 応用例と広範囲にわたるアナリティカルスタンダード

Eva Katharina Richter, Product Manager Analytical Standards evakatharina.richter@sial.com
Anders Fridstrom, European Marketing Manager, HPLC anders.fridstrom@sial.com

アスペルギルス属、フザリウム属、ペニシリウム属等のいくつかの菌類は、マイコトキシンを生産します。汚染された農作物や果物を通して、または、加工食品や餌を通して食物連鎖に混入すると、これらの菌類の有毒な二次代謝産物が動物やヒトの健康に害を及ぼします。そのため、少なくとも 100 カ国で、食品と飼料のマイコトキシン濃度が規制されています。全ての規制されたマイコトキシンを正確に検出するために、シグマ アルドリッチは新しい HPLC 応用例とアナリティカルスタンダードを提供します。

Ascentis® Express F5 を使用したデオキシニバレノール（DON）代謝産物の HPLC 分析

デオキシニバレノール（DON、**Figure 1**）は、フザリウム属によって生産されるトリコテセンマイコトキシンであり、非常に一般的な穀物の汚染物質です。活動と免疫機能の低下を伴い、家畜動物の飼料摂取と体重の減少などのいくつかの毒性作用が知られています [1]。

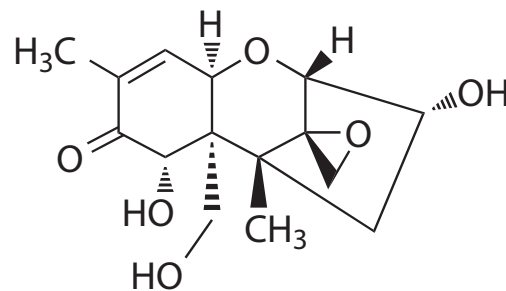



Figure 1 Molecular structure of deoxynivalenol (DON)

Supelco® の Ascentis Express F5 HPLC カラムは、10 分以内に 15 種類のマイコトキシンの分離を行います（**Figure 2**）（位置異性体である 15-Ac-DON と 3-Ac-DON が分離されていることに注目してください）。このカラムは、極めて類似した物質を、より正確に速く分離、定量できる非常に優れた研究および品質管理ツールです。

Positive Ions	Ascentic Express F5 Rt (min)
Nivalenol	2.0
DON	2.9
15 Ac DON	4.9
3 Ac DON	4.9
Aflatoxin G2	6.2
Aflatoxin G1	6.4
Aflatoxin B2	6.6
Aflatoxin B1	6.8
Atrazin D5	6.5
Fumonisin B1	8.5
T-2 Toxin	7.2
Fumonisin B2	9.0
Ocratoxin A	7.7
Sterigmatocistin	8.0
TFF	7.8

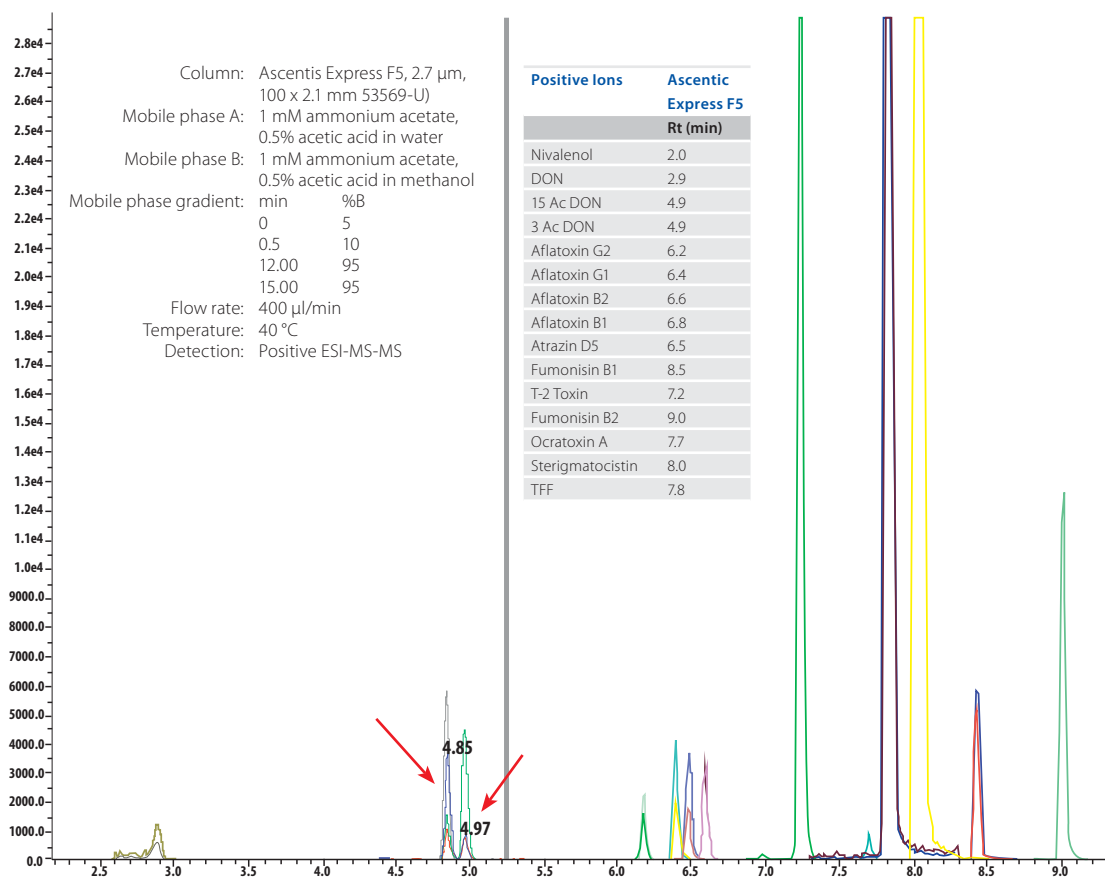



Figure 2 Separation of mycotoxins on Ascentis Express F5 (Positive Ion Mode). Red arrows indicate deoxynivalenol (DON) metabolites (the chromatogram was kindly provided by Enio Belotti, Water & Life Lab SRL, Entratico / Italy).

フザリウム属のマイコトキシンスタンダード

Table 1 をご覧ください。食品および飼料中のデオキシニバレノール（DON）の正確な品質管理のために未希釈、^{13}C で同位体ラベルされたスタンダード、混合溶液を含む入手可能なスタンダードが全て記載されています。シグマ アルドリッチは分析機器の校正と回収率試験用の認証標準物質（CRMs）を提供しています。IRMMからリリースされ、シグマ アルドリッチが販売しているCRMsは、自然の状態で実際の試料にできるだけ近づけるために、原材料で製造されます。シグマ アルドリッチは、デオキシニバレノール分析の性能管理のためにトウモロコシ粉の標準物質を提供します。マイコトキシンスタンダードと標準物質の一覧については、ウェブサイト sigma-aldrich.com/mycotoxins でご覧いただくか、カタログをアナリティカル製品グループまでご請求ください。

Reference:

[1] **Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J.** Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *J Toxicol Environ Health*. 48(1): 1–34 (1996).

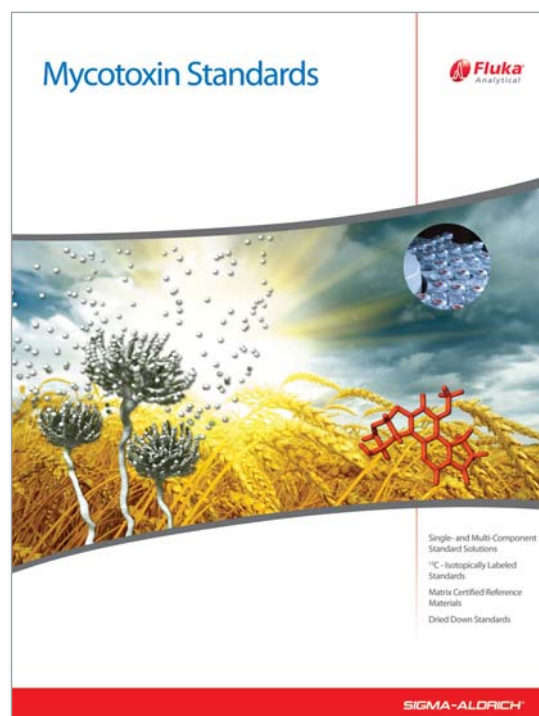



Figure 3 New mycotoxin standards brochure

Cat. no.	Description	Concentration	Solvent	Package size
Neats				
32927	3-acetyldeoxynivalenol			5 mg
32928	15-acetyldeoxynivalenol			5 mg
32943	Deoxynivalenol			5 mg
Solutions				
34132	3-acetyldeoxynivalenol	100 µg/g	Acetonitrile	2 mL
34133	15-acetyldeoxynivalenol	100 µg/g	Acetonitrile	2 mL
34129	Acetyl-deoxynivalenol-D_3	100 µg/g	Acetonitrile	2 mL
46911	Deoxynivalenol	200 µg/g	Ethylacetate/Methanol (95/5)	1 mL
34155	Deoxynivalenol-D_1	100 µg/g	Acetonitrile	2 mL
34135	Deepoxy-deoxynivalenol	50 µg/g	Acetonitrile	2 mL
34124	Deoxynivalenol	100 µg/g	Acetonitrile	2 mL
32911	Deoxynivalenol-3-glucoside	50 µg/g	Acetonitrile	1 mL
^{13}C-Isotopical Labeled				
32962	3-acetyldeoxynivalenol-$^{13}C_{17}$	25 µg/mL	Acetonitrile	1 mL
34128	Deoxynivalenol-$^{13}C_{15}$	25 µg/mL	Acetonitrile	1 mL
Mixture Solutions				
32926	Trichothecene Mix (3-AcDON, DON, NIV, FusX, HT-2, T-2, DAS, ZON)	10 µg/mL (each)	Acetonitrile	1 mL
34134	B-Trichothecen Mix (DON, NIV, 3-AcDON, 15-AcDON)	100 µg/mL	Acetonitrile	2 mL
Reference Materials				
BCR377	Maize flour (Deoxynivalenol, blank)	<50 µg/kg		150 g
IRMM315	4-Deoxynivalenol	25.1 µg/g	Acetonitrile	4 mL

Table 1 Analytical standards for deoxynivalenol (DON) metabolite analysis

Standards

LC/MS システムに問題はありませんか？　質量校正とシステムテストスタンダード

Rudolf Köhling, Namtso Reichlin rudolf.koehling@sial.com

システムテストスタンダード

最新の HPLC や UHPLC システムは非常に複雑なシステムですが、日常業務においてあまり注意を払わなくても正しく機能するように改良されてきました。年次保守と IQ/OQ/PQ 確認により、ハードウェアの仕様が担保されます。しかし、これには HPLC と MS の機器本体のみが含まれ、日常業務におけるクロマトグラフィーの結果には適用されません。システムテストスタンダードは、検出器のタイプの違い、カラムの激しい使用、高いマトリックス負荷、ランプの長時間使用などに起因する性能劣化の可能性を含む、クロマトグラフィー系の現在の性能をモニターすることに役立ちます。さらに、システムテストスタンダードは故障の原因を示唆し、トラブルシューティングのための時間を短縮する場合があります。

質量校正とシステムチューニングスタンダード

多くのの質量分析計は、同位元素の判別に十分な +/– 0.5 Da の m/z 分解能を持つ四重極形質量分析計を一つ備えています。より複雑な分析計は、その他に四重極型マスセレクターおよびコリジョンセルを備えたトリプル四重極型やイオントラップ型、飛行時間型またはフーリエ変換型（Orbi Traps）を含む質量分析計を装備しています。この種のシステムでは、分析対象物の正確で高感度な検出とフラグメンテーションを担保するために、イオン・トランスファー、イオン蓄積および質量スキャン校正を定期的に最適化することが必要です。このためには、選択した質量範囲に応じた質量校正スタンダードが必要です。分子式の決定には高分解能と特に 50 ～ 1000 Da のレンジで正確に質量校正されたマスクペクトラムが不可欠です。

校正と検定の連携 — LC/UV/CAD/MS システム

データ収集を始める前に多くの LC-MS 分析計では、精密質量、精度、および MS/MS 分離（イオントラップ）やフラグメンテーションにおける最高感度を担保するために校正が必要です。特に高分解能飛行時間型質量分析計で最高の精密質量を得ようとする場合には、1 日につき数回の定期的な校正をする必要があります。塩溶液および高分子溶液は、広い m/z レンジで、規則的な m/z パターンを生じます。ギ酸リチウム溶液およびギ酸ナトリウム溶液は、特に 1500 Da までの m/z レンジでの校正に適しています。これはエレクトロスプレーイオン化法を用いた大部分の低分子のLC-MS 分析に適合します。アルカリ金属ギ酸塩クラスターのもう 1 つの利点は、1 段階で +/– 両方の ESI モードを使えることです。**Figure 1** は、ギ酸リチウムクラスターの質量スペクトル（ESI +/–）です。

HPLC 性能と MS 感度検定

うまく設計され検定された HPLC/MS や UHPLC 適応したシステムでさえ、潜在的な誤差要因を含んでいます。質量分析計への接続では故障や性能低下の可能性が高まります。LC-MS システムの各コンポーネントを検定する方法がいくつかありますが、これらは包括的な保守に役立ちますが時間のかかるプロセスです。

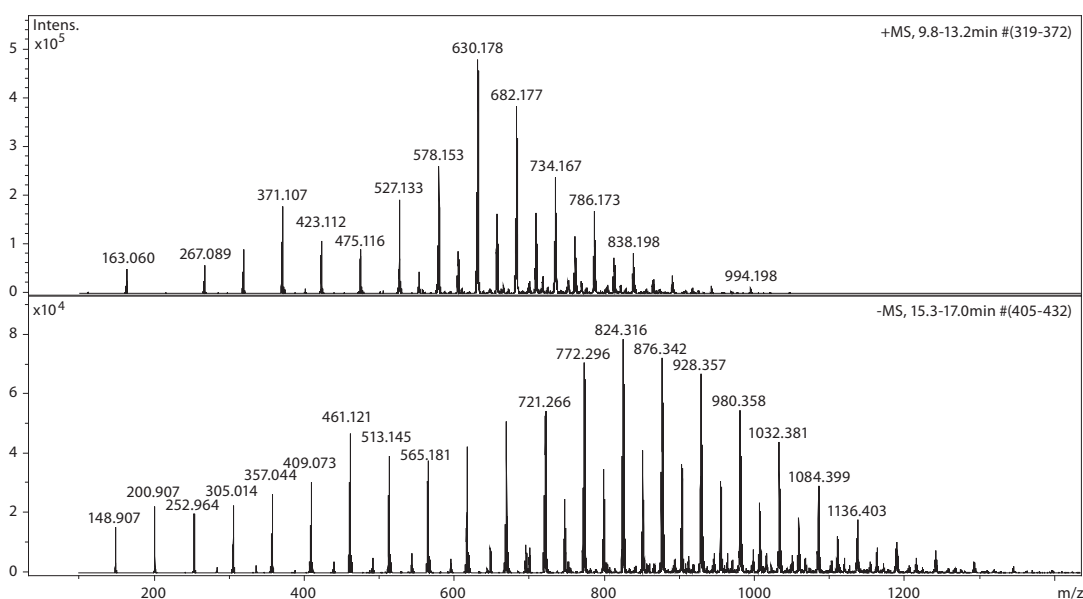



Figure 1 ESI LC-MS spectra of lithium formate solution (Fluka®) in positive (upper) and negative ion mode (bottom). The regular pattern of the $[Li_{(x+1)}(HCOO)_x]^+$ and $[Li_x(HCOO)_{(x+1)}]^-$ cluster can be used to calibrate a mass range up to 1200 m/z, which covers most of the small molecules.

一方、日常業務では、UHPLC と質量分析計の性能を確認する頑健な試験を必要とします。主な目的は、イオン源の感度とクロマトグラフィーの分離能です。システムテスト用スタンダードを注入してピーク高さ、ピーク幅、S／N 比、ピーク対称性（シンメトリー）をチェックすることによって、カラムを含む HPLC システム性能を評価することができます。これらの各パラメーターが管理チャートに定期的に記録されれば、すぐに変化に気づくことができます。**Figure 2** は、クロマトグラフィーの異常がレセルピン（テスト化合物）のピーク形状とピーク位置により分かります。溶媒中の不純物である鉛は MS のシグナルサプレッションを導きます。

カフェイン、レセルピン、ジゴキシン、低分子、ペプチドおよびタンパク質は、HPLC と MS をチェックするのに適した化合物です。スペクトルデータから検出器のコンディションついての付加情報が得られます。**Figure 3** は、レセルピンから得られた質量スペクトルを示しています。これは、例えばギ酸リチウム溶液下で分析計（LC/MS）の分解能と精度校正のチェックに利用されます。カフェインも同様の目的に使われ、MS 検出（低質量レンジ）または UV 検出にも用いられます。カフェインの UV スペクトルは、UV 検出器の調整と分解能、および UV/VIS ランプの性能チェックに有用です [1]。

これらの標準物質のほとんどは分析機器の性能を確認するのに用いられ、検定結果を分析機器仕様と比較する場合に有用です。

Reference

[1] J. Emmert, Labor & More, 5 (2008), 56-57.

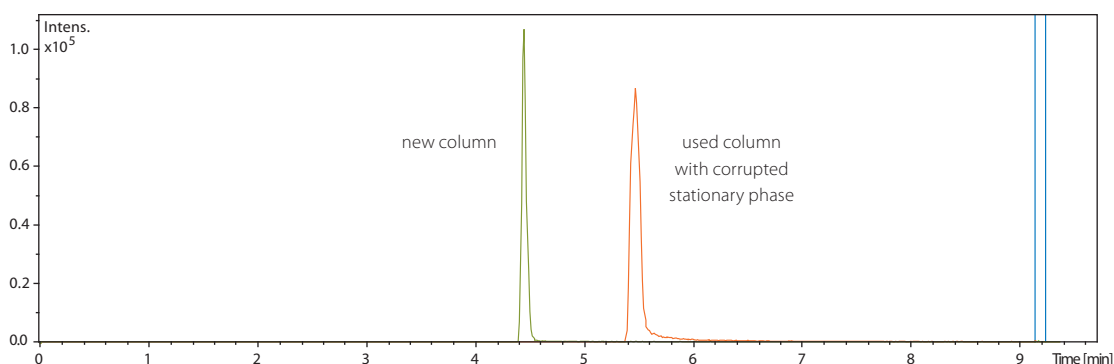
Cat. No.	Brand	Description
01886	Fluka®	Lithium Formate Solution, Suitable for LC-MS, 10 mM LiOH in isopropanol/water 1:1 (+0.2% HCOOH)
97574	Fluka	Sodium Formate Solution, Suitable for LC-MS, 10 mM NaOH in isopropanol/water 1:1 (+0.2% HCOOH)
43530	Fluka	Reserpine Standard for LC-MS, analytical standard, for LC-MS
56396	Fluka	Caffeine, certified reference material, TraceCERT®
MSCAL1-1KT	Sigma	ProteoMass Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit
D6003	Fluka	Digoxin, analytical standard

Standards

Figure 2 Influence of an aged column on the performance of a separation. 5 µl of a 5 ppm reserpine standard is injected and monitored over a column lifetime. Peak height and symmetry decreases. UHPLC separations especially react sensitively to instrumental errors (extra volume, valve malfunction, clogging, or performance loss in the stationary phase).

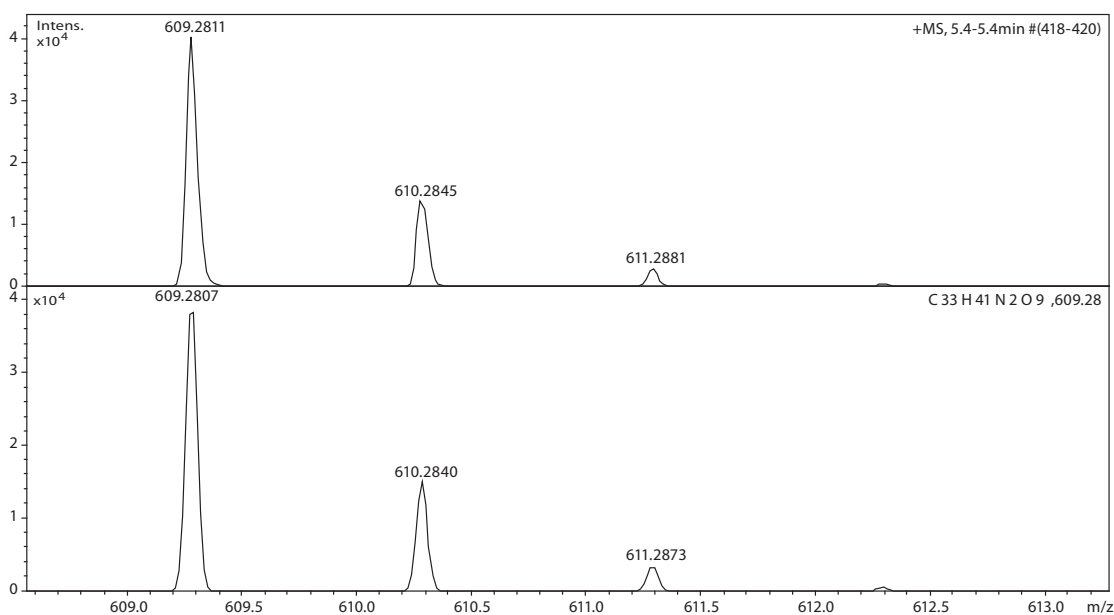



Figure 3 Acquired and calculated mass spectrum of reserpine. The difference of the peak position is only 0.7 ppm. The resolution is 11000 in standard resolution mode. This agrees with the specification of the manufacturer and indicates an optimum setup.

^{13}C で標識した内部標準を用いたパラベンの定量化

Matthias Nold, Product Manager, Analytical Standards matthias.nold@sial.com

パラベンはパラオキシ安息香酸エステルで、主にメチルパラベン、エチルパラベン、n- プロピルパラベン、n- ブチルパラベンなどです。これらの化合物はその抗菌作用から、抗菌剤や防腐剤として様々な分野で広く利用されています。

医薬品業界では、パラベンは医薬品の防腐剤として役立っています。医薬品中の濃度については、許容される上限は特に定められていませんが、公表しなくてはなりません。化粧品分野ではパラベンはクリーム、ローション、メークアップ、口紅、アフターシェーブローション、石鹸、日焼け止め、除毛剤、シャンプー等のパーソナルケア製品の防腐剤として使用されています。指令 76/768 EWG VI ならびに化粧品指令付録VIにおいて、単一成分として 0.4%、パラベン混合物として 0.8%の濃度が許容されています。栄養補助食品としては、パラベンは E214 から E219 までの番号で指定されています。これらの用途に加え、パラベンはまた工業用油脂類、糊、靴磨き用クリームの防腐剤としても利用されています。

パラベンの防腐的特性は先に述べたすべての用途において望ましいものですが、この特性も弱点となってしまう場合があります。というのも、分子が経口または皮膚を通して吸収され、血流によって体内中に広がり、最終的に臓器あるいは組織に達してからも防腐が継続するからです。パラベンは胸部組織、母乳 [Ye et al. 2008]、尿 [Ye et al. 2006]、および血清 [Janjua et al. 2007] 中に発見されています。パラベンはまた乳がんの組織 [Darbre et al. 2004] にも見つかっていることから、がんを引き起こす可能性が疑われています。この懸念がドイツ連邦リスク評価研究所 (BfR) の研究によって裏付けられることはなかったものの、ほとんどの研究はがんとパラベンの関連の可能性を除外するためにさらなる研究を行う必要があると主張しています。

パラベンは広く利用されているため、ハウスダスト中 [Canosa et al. 2007] や排水中 [Blanco et al. 2009] など、ほとんどの場所で見つかります。また、パラベンは下水処理場で完全に分解されない [Nieto et al. 2009] ことから、表流水 [Canosa et al. 2006] 中でも見つかっています。この時、パラベンが in vitro でもエストロゲンレセプターと結合した状態で見つかっており、in vivo ではエストロゲン同様の特性 [Routledge et al. 1998] を有することが確認されていることから、特に懸念されます。ただし、パラベンのエストロゲン活性は生理的ホルモンの 17- β - エストラジオールより 103 〜 106 倍弱いことがいくつかの研究で示されています。エストロゲン活性はブチルパラベンが最も強く、化粧品に最も広範に用いられるメチルパラベンはかなり弱いエストロゲン活性を示しました。さらに、in vitro 実験では、アンドロゲンレセプターへの弱い親和性を示しました。また、ヒトの生殖能の質に対する影響も証明されています [Kang et al. 2002]。したがって、パラベンは内分泌攪乱化学物質 (EDCs) であると考えられます。

分析

化粧品用の手順同様、食品に含まれるパラベンの規制にも正確で信頼できる分析定量化が必要です。質量分析の手法を用いる際に、同位体標識された内部標準を使用することで誤差を最小限に抑えることができます。GC-MS では、インジェクターまたはカラムの活性点における吸着効果が起こる可能性があります。LC-MS/MS を用いる際には、マトリックスによるサプレッションが問題となることがよくあります。いずれの場合も標的分析物の測定値がかなり低くなってしまいます。

標的分析物の損失分は計算によって補正できることから、これらの問題は定められた量の内部標準を添加することで回避できます。用いられる内部標準の物理化学的特性が標的分析物と非常に類似している場合、この補正は非常に正確となります。同位体標識された内部標準を用いる場合がまさにそのケースです。内部標準と標的分析物が類似しているので、クロマトグラフィーの保持時間がほぼ同じとなります。**Figure 1** に最も一般的な $^{13}C_6$ で標識した芳香環を持つパラベンを示します。

(continued on page 7

Methylparaben (Ring-$^{13}C_6$) Ethylparaben (Ring-$^{13}C_6$) n-Propylparaben (Ring-$^{13}C_6$) n-Butylparaben (Ring-$^{13}C_6$)

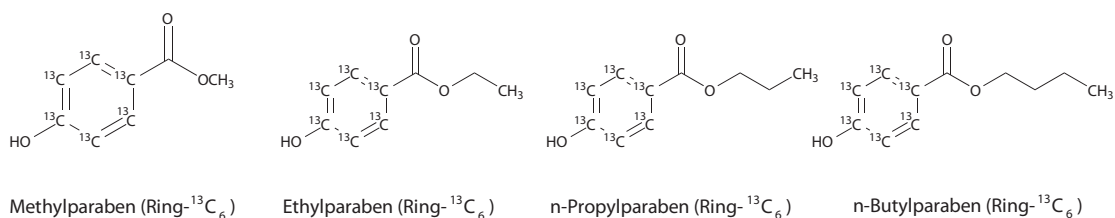



Figure 1 Molecular structures of ^{13}C ring labeled parabens

Figure 2 には、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、ベンジルパラベン、および ^{13}C で標識したそれぞれの内部標準を示します。シグマアルドリッチでは、最も一般的なパラベンの標準物質（**Table 2**）と、^{13}C 標識の標準物質（**Table 1**）を提供しています。標識された標準物質は、濃度 10 μg/mL と 50 μg/mL のアセトン溶液として提供しています。また、標識なしの標準物質は認証標準物質（CRM）として 1g パッケージ入りで販売しています。これらの未希釈標準物質は ISO/IEC 17025 と ISO Guide 34 のダブル認定を受けた条件で生産され、USP および EP 標準物質にトレーサブルです。

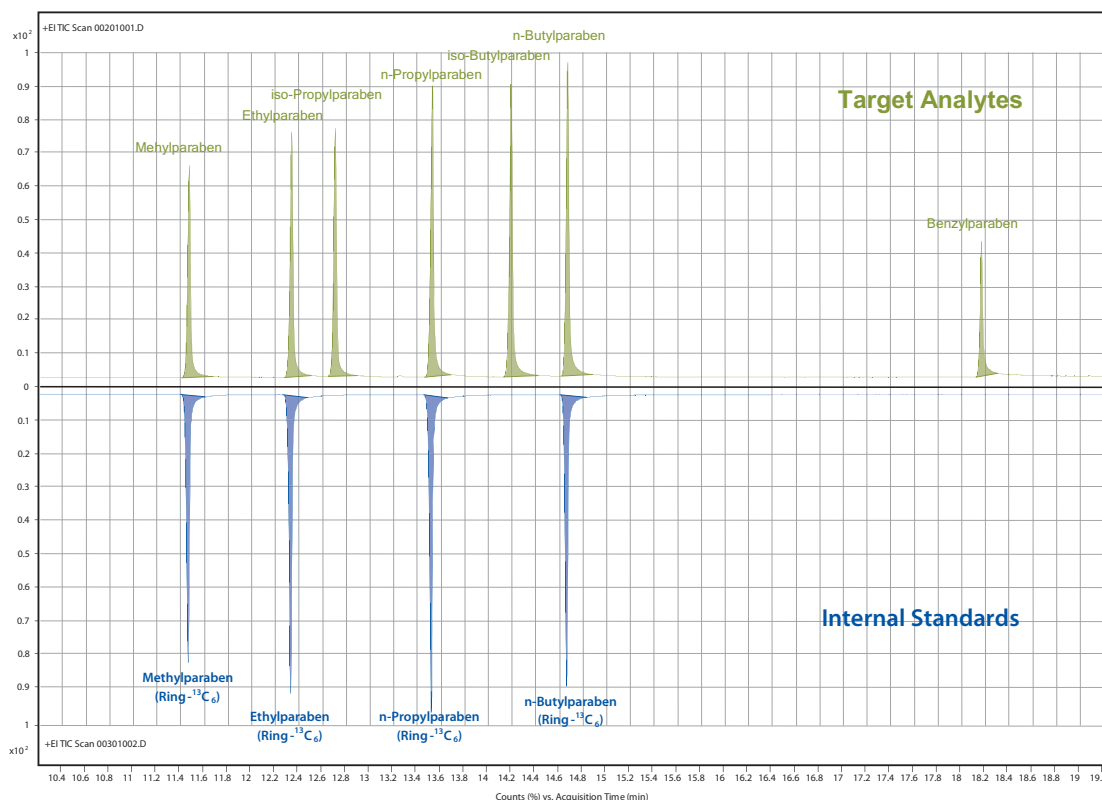



Figure 2 Chromatogram of parabens and ^{13}C-labeled internal standards

GC Conditions:

instrument: Agilent GC 7890A
detector: Agilent MS 7000 QQQ
column: HP-5MS, 5% phenyl polymethylsiloxane, 25 m x 0.25 mm, 0.25 µm (L x ID, FT)
oven program: 760 °C (1 min), 10 °C/min to 200 °C, 15 °C/min to 280 (10 min)
carrier gas: helium, 1.2 mL/min
injection: 2.0 µL splitless
injector: Gerstel CIS
injector temperature program: 60 °C, 12 °C/to 280 °C (2 min)

(continued on page 8)

Standards

Compound	Cat. no.	Concentration	Package size	Cat. no.	Concentration	Package size
Methylparaben (Ring-$^{13}C_6$)	32557	50 µg/mL in acetone	1 mL	32556	10 µg/mL in acetone	5 mL
Ethylparaben (Ring-$^{13}C_6$)	32559	50 µg/mL in acetone	1 mL	32558	10 µg/mL in acetone	5 mL
n-Propylparaben (Ring-$^{13}C_6$)	32562	50 µg/mL in acetone	1 mL	32561	10 µg/mL in acetone	5 mL
n-Butylparaben (Ring-$^{13}C_6$)	32564	50 µg/mL in acetone	1 mL	32563	10 µg/mL in acetone	5 mL

Table 1 ^{13}C labeled paraben standard solutions

Brand	Cat. no.	Description	Package size
Fluka®	PHR1012	Methylparaben pharmaceutical secondary standard	1 g
Fluka	PHR1011	Ethylparaben pharmaceutical secondary standard	1 g
Fluka	PHR1010	n-Propylparaben pharmaceutical secondary standard	1 g
Fluka	PHR1022	n-Butylparaben pharmaceutical secondary standard	1 g

Table 2 Non labeled paraben standards

Description	Components	Cat. no.	Concentration	Package size	Cat. no.	Concentration	Package size
Paraben Internal Standard Mix-Solution	Methylparaben Ring-13C6 Ethylparaben Ring-13C6 n-Propylparaben Ring-13C6 n-Butylparaben Ring-13C6	32124	10 µg/mL each component in acetone	5mL	32125	50 µg/mL each component in Aceton	1mL
Paraben Target Analyte Mix-Solution	Methylparaben Ethylparaben *n*-Propylparaben *iso*-Propylparaben *n*-Butylparaben *iso*-Butylparaben Benzylparaben	32126	10 µg/mL each component in acetone	5mL	32127	50 µg/mL each component in Aceton	1mL

Table 3 Paraben Mix-Solutions

References

[1] Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic, Toxicol. Appl. Pharmacol. 153 (1998) 12–19.

[2] Canosa, P., Rodriguez, I., Rubi, E., Cela, R. Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry, Anal. Chem. 79 (2007) 1675–1681.

[3] Blanco, E., Maria del, C.C., Maria del, C.M., Cela, R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis, Anal. Chim. Acta 647 (2009) 104–111.

[4] Canosa, P., Rodriguez, I., Rubi, E., Bollain, M.H., Cela, R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 3–10.

[5] Ye, X., Bishop, A.M., Needham, L.L., Calafat, A.M. Automated on-line column switching HPLC–MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 150–156.

[6] Janjua, N.R., Mortensen, G.K., Andersson, A.M., Kongshoj, B., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 5564–5570.

[7] Ye, X., Bishop, A.M., Reidy, J.A., Needham, L.L., Calafat, A.M. Parabens as urinary biomarkers of exposure inhumans, Environ. Health Perspect. 114 (2006) 1843–1846.

[8] Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J. Concentrations of parabens in human breast tumours, J. Appl. Toxicol. 24 (2004) 5–13.

[9] Kang, K.S., Che, J.H., et al Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben), The Journal of Veterinary Medical Science 64 (2002), 227–235.

[10] Nieto, A., Borull, F., Marce, R.M., Pocurull, E. Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5619–5625.

[11] SCF 1996, Scientific Committee on Food, Opinion on p-hydroxybenzoic acid alkyl esters and their sodium salts, 25 February 1994, 35th series of reports of the SCF.

[12] SCCS 2011, Scientific Committee on Consumer Safety, Opinion on Parabens, 22 March 2011, SCCS/1348/10.

[13] SCF 2003, SCF/CS/ADD/CONS/53 Final: Statement of the Scientific Committee on Food on Parabens.

ビタミン D_3 定量化 – 不適当な溶媒のエレクトロスプレーイオン化（LC-MS）への影響

Rudolf Köhling, Senior Scientist, R&D LC-MS Applications rudolf.koehling@sial.com

ルーチン分析では、サンプル測定数を増やすためにLC-MS 手法の最適化が行われます。LC-MS は多くの改良により感度は向上してはいるものの、サプレッション効果等の影響を受ける事が知られています。定量分析はサンプル調製を含め、使いやすく正確でかつ費用効果が高くなければなりません。サンプル当りのコストを計算する際に、溶媒の品質は重要な要素になりえます。LC-MS 用として試験されていない低グレード溶媒は、不純物により干渉を引き起こし、結果的に各試験のコストが高くなる可能性があります。本報告の結果は、低グレードの溶媒が MS 検出感度に及ぼす影響（シグナルサプレッション効果）を示しています。最も一般的なイオン源であるエレクトロスプレーイオン化（ESI: electrospray ionization）は、不純物が多い溶媒がイオン源に入るとこの影響を強く受けます。本報告は臨床診断における一般的な事例で、アセトニトリル中のイオン不純物が定量分析に与える影響を示します。

Figure 1 a) UV chromatograms of 5 injections of vitamin D_3 at 254 nm using 2 different grades of acetonitrile.
b) UV chromatogram of 5 injections of 25-hydroxyvitamin D_3 repeating the experiment of vitamin D_3. The UV data indicates the robustness of both the chromatographic separation and the precision of the UHPLC-MS system.

実験

ESI サプレッション効果

ビタミン D_3 とその代謝物 25- ヒドロキシビタミン D_3 をメタノール（LC-MS Ultra Methanol, Fluka® 14262）に溶解します。標準液は 5 μg/mL（ビタミン D_3）および 0.5 μg/mL（25-ヒドロキシビタミン D_3）に調整しました。超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC システム、Dionex Ultimate 3000 RSLC binary）に 3 種類の異なる溶媒を接続します。チャンネル B は高品質の LC-MS Ultra アセトニトリル、チャンネル C は LC-MS Ultra 水／0.1%ギ酸（LC-MS Ultra）pH3.5、チャンネル D は他社製アセトニトリル（生物学的分析や環境分析用のグラジエントグレード）から成ります。システムをチャンネル B の LC-MS Ultra アセトニトリル溶媒（100%）で置換後、チャンネル B と C の高品質な溶媒を最初に用いて 6 回ビタミン D_3 の注入を行い定量しました。次にチャンネル D のグラジエントグレード溶媒に置き換えて、同様に 6 回ビタミン D_3 の注入を行い定量しました。更にチャンネル B の LC-MS Ultra アセトニトリル溶媒（100%）でシステムをバックフラッシュ洗浄した後、同じ手順で 25- ヒドロキシビタミン D_3 について測定を繰り返しました。

Mass spectrometer (Bruker micrOTOF-Q II)	tune_low.m, 45 psi (sprayer), 7 L/min (dry gas), 180 °C (dry gas temp), ESI(+)
HPLC (Dionex Ultimate 3000 RSLC) Column:	Supelco® Ascentis® Express C18, 2.1x50 mm or comparable column
Flow:	0.6 mL/min
Gradient:	0 min (50% C), 5 min (10% C) Post time: 2.5 min
Temperature:	35 °C
Injection Volume:	2 μL (vitamin D_3)/4μL (25-hydroxyvitamin D_3)
UV Wave Length:	254 nm

Table 1 LC-MS Method for Vitamin D_3/Hydroxyvitamin D_3

超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）グレード溶媒のグラジエント試験

品質の異なるアセトニトリル溶媒を試験するために 95% 水から始まり、95%アセトニトリルで終わる急勾配のグラジエントを行いました。LC-MS Ultra 水とアセトニトリルを基準とし、UV および MS（BPC/TIC）のベースラインが一定となるまでこの工程を繰り返しました。

Mass spectrometer (Bruker micrOTOF-Q II):	tune_low.m, 45 psi (sprayer), 7 L/min (dry gas), 180 °C (dry gas temp), ESI(+/-), spectra rate 2 Hz
HPLC (Dionex Ultimate 3000 RSLC):	
Column:	Supelco Ascentis Express C18, 2.1x50 mm or comparable column
Flow:	0.6 mL/min
Gradient:	0 min (95% A), 6 min (5%), 9 min (5%)
Post time:	3 min
Temperature:	35 °C
UV Wave Lengths:	210, 254

Table 2 Gradient method

Chromatography

結果

不適切な溶媒によるイオンサプレッション

UV 検出器でのクロマトグラムは、どの品質の溶媒でもビタミン D_3 および 25- ヒドロキシビタミン D_3 に影響がありませんでした。LC-MS Ultra アセトニトリルから他社のグラジエントグレードの製品に変えても、ピーク位置、サイズ、形状は変化しませんでした（**Figure 1**）。UV データはクロマトグラフィー分離と UHPLC-MS システム精度の両方の安定性を示しています。一見すると両溶媒共にこの種の用途に適しているように見えます。ところが質量分析データを注意深く見てみると、すべての EIC は UV クロマトグラムと同じピークサイズであるはずが、他社グラジエントグレードのアセトニトリルで $[M+H]^+$ イオンのシグナル強度が著しく低いことが観察されます（**Figure 2**）。このことから、他社グラジエントグレードのアセトニトリルに含まれる不純物は、紫外光は吸収しないものの、質量分析装置の ESI でイオンサプレッションを引き起こすことが結論づけられます。残念ながら、グラジエントグレードにおけるのイオン性不純物（アルカリ金属等）種が特定されていませんが、バックグラウンドの平均マススペクトルはギ酸ナトリウムクラスターの典型的なパターンを示しています（**Figure 5**）。

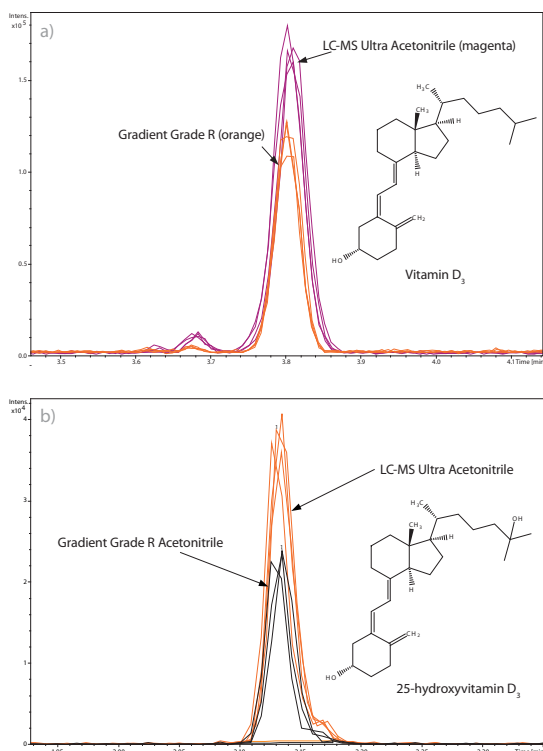



Figure 2 a) EICs([M(vitamin D_3)+H]$^+$=385.4 Da of LC-MS Ultra acetonitrile and competitor acetonitrile. The loss of sensitivity concerning the isomer of vitamin D_3 at 3.68 min is remarkable. With LC-MS Ultra acetonitrile, this isomer is detectable and it is below the LOD with the lower quality solvent. b) EICs([M(25-hydroxyvitamin D_3)+H]$^+$=407.4 Da) of repeated experiments using different quality grades of acetonitrile show the same ion suppression effect with the lower quality solvent.

異なる種類の UHPLC 溶媒の比較

ビタミン D_3 の例は、MS 適用試験がされていない溶媒では重大な感度影響があることを示しています。ところが、UHPLC-MS の溶媒であっても急勾配のグラジエント手法によって示されるように、MS クロマトグラムにはかなりの差異が生じます。この試験を UHPLC 条件下で、特に 2 つの複合検出システムを用いて実施すると、両溶媒に含まれる不純物に関する詳細が明らかになります。異なる品質の UHPLC/UHPLC-MS アセトニトリルの UV データを **Figure 3** に、ESI（+）データを **Figure 4** に示します。ほとんどが UV 検出には適しているように見える一方、MS データにおいては、LC-MS Ultra のアセトニトリル以外のすべてのクロマトグラムで UV 吸収の無い不純物の検出やベースラインノイズが検出されています。

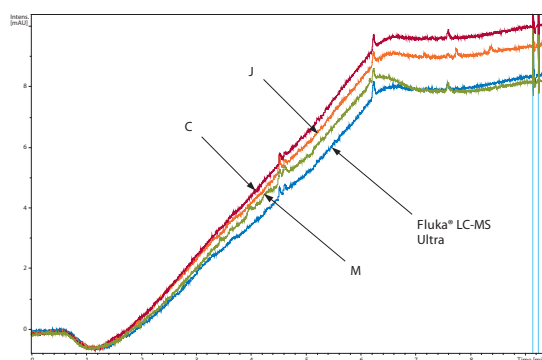



Figure 3 UV chromatograms of different UHPLC/UHPLC-MS acetonitrile manufacturers tested with the UHPLC gradient method against LC-MS Ultra water. Even at 210 nm, there are only minor differences.

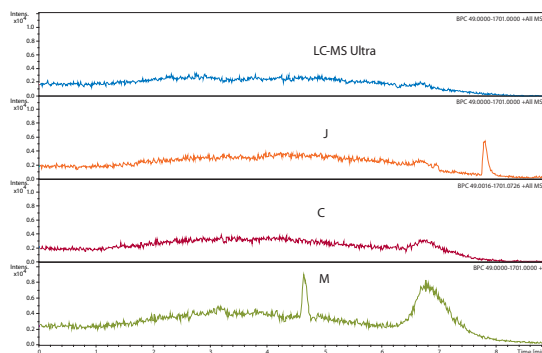



Figure 4 The base peak chromatograms (BPC) of the corresponding UV data in **Figure 2** reveal the real differences and show a higher baseline and/or additional peaks compared to the reference solvents (LC-MS Ultra). Quality M and R are comparable although one is tested for LC-MS and the other is not.

結論

高純度という品質と高感度の UV グラジエント手法によって得られるのは、溶媒の MS 検出に対する適性のおおまかな情報です。これに対し、UV では検出されないイオンが含まれていた場合、どのような種類のイオンであっても、**Figure 2** に示すように、ESI では著しく感度の影響を受けます。

(continued on page 16)

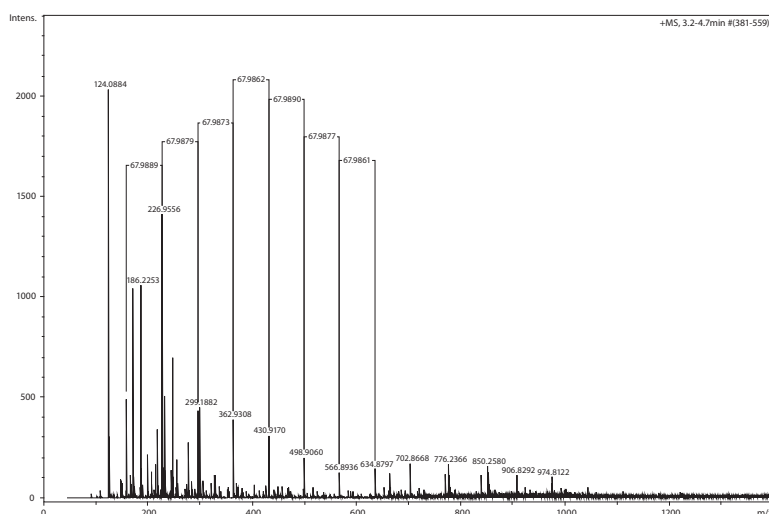



Figure 5 Background of vitamin D_3/25-hydroxyvitamin D_3 chromatogram with low-quality acetonitrile. The spectrum is typical for alkali formate clusters. The high abundance of sodium can be responsible for this considerable ion suppression effect.

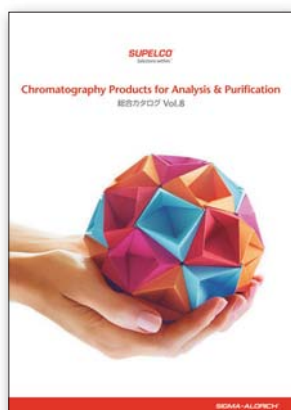
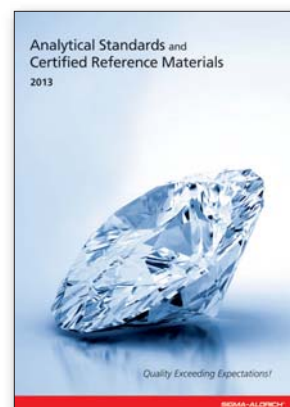
Figure 5 はこれらの工程のバックグラウンド分析を示したもので、3.2 ～ 4.7 分の間のスペクトルの平均マススペクトルとビタミン D_3 ピークとのオーバーラップを示しています。これはギ酸ナトリウムクラスターに特有のパターンで、非常に高い強度を示しています。結果として生じるサプレッション効果で定量下限値（LOQ）は低くなる可能性があり、装置の寿命に対しても悪影響を及ぼします。溶媒の品質が不適切である場合、試料当たりのコストは低く抑えられるかもしれませんが、定量下限値が悪くなるために濃縮や精製などに対するサンプル調製の作業が必要となりコストが高くなってしまう場合があります。

References

[1] Pucci, V., Di Palma, S., Alfi eri, A., Bonelli, F., Monteagudo, E. A Novel Strategy for Reducing Phospholipids-based Matrix Effect in LC–ESI-MS Bioanalysis by Means of HybridSPE. J. Pharm. Biomed. Anal. 2009, 50(5), 867–871.

[2] Ismaiel, O. A., Zhang, T., Jenkins, R. G.; Karnes, H. T. Investigation of Endogenous Blood Plasma Phospholipids, Cholesterol and Glycerides that Contribute to Matrix Effects in Bioanalysis by Liquid Chromatography/MassSpectrometry. J. Chromatogr., B, 2010, 878, 3303–3316.

[3] Mano, N., Nozawa, M.; Sato, M.; Mori, M., Yamaguchi, H.; Kanda, K., Nogami, M.; Goto, J., Shimada, M. Identification and Elimination of Ion Suppression in the Quantitative Analysis of Sirolimus in Human Blood by LC/ESI-MS/MS. J. Chromatogr., B, 2011, 879, 968–974.

[4] Annesley, T. Ion Suppression in Mass Spectrometry. Clinical Chemistry, 2003, 49, 7, 1041–1044.

残留溶媒の分析における高純度ヘッドスペースグレード N,N-ジメチルアセトアミド（DMA）

Shyam Verma, Market Segment Manager shyam.verma@sial.com

Contributed article
Melissa P Grella, Jessica Hoover, and Mark Shapiro
PharmaCore, Inc, High Point, NC 27265, USA

医薬品中の残留溶媒は、原薬や医薬品添加物の製造工程で使用、または生成する溶媒の残留物である揮発性有機不純物（OVI）と定義されています。残留溶媒は、クラス 1 溶媒（避けるべき溶媒 — ヒトにおける発がん性が知られている溶媒、ヒトにおける発がん性が強く疑われる溶媒および環境に有害な影響を及ぼす溶媒）、クラス 2 溶媒（制限すべき溶媒 — 遺伝毒性は示さないが動物実験で発がん性を示した溶媒、その他の何らかの可逆的な毒性が疑われる溶媒）、クラス 3 溶媒（潜在的に低毒性の溶媒で、健康上の理由に基づく曝露限度値の設定は必要ない）に分類されます。溶媒は製造工程では完全には除去できません。そのため、これらの溶媒濃度が USP と ICH ガイドラインの定める限度以内であることを確認するために試験を行います [1, 2]。

スタティック（静的）ヘッドスペース GC（HS-GC）は OVIs 分析に用いられる一般的な技術です。この技術により揮発性分析物を濃縮し、試料マトリックスから影響を受けないようにします。HS-GC で分析する試料は適切な溶媒に溶解する必要があります。*N,N*-ジメチルアセトアミド（DMA）は医薬品中の OVIs のヘッドスペース分析に一般的に用いられる有用な溶媒です。

実験

異なる純度グレードの DMA を用いて比較を行いました。溶媒 1 mL をピペットで 10 mL ヘッドスペースバイアルに移してブランク試料を調製しました。ブランク試料は HS-GC によって分析しました。この比較で用いた各種分析には、シグマ アルドリッチの高純度 GC-HS グレード DMA（製品番号 44901）を使用しました。残留溶媒のストックスタンダード（標準原液）から試験する各残留溶媒を取り出すためにポジティブディスプレイスメント式ピペットを用いました。この標準原液を DMA で希釈し、標準溶液を調製しました。標準溶液中の各溶媒の濃度は各溶媒既知の密度と添加容量を用いて計算しました。標準溶液をヘッドスペースバイアルに分注し、DMA のブランク試料とともに順番に GC ヘッドスペースによって分析しました。**Table 1** に各種の残留溶媒のクラスとそれぞれの ICH の限度値を示します。また、それぞれに分析された残留溶媒のクロマトグラムを **Figure 2, 3** に示します。

Compound	ICH Solvent Class	ICH Limit (ppm)
Acetone	3	5000
Acetonitrile	2	410
Dichloromethane	2	600
Diethyl ether	3	5000
Dimethylformamide	2	880
1,4-Dioxane	2	380
Ethanol	3	5000
Ethyl acetate	3	5000
Hexane	2	290
Heptane	3	5000
Isopropanol	3	5000
Isopropyl acetate	3	5000
Methanol	2	3000
Methyl t -butyl ether	3	5000
Methycyclohexane	2	1180
2-Methyltetrahydrofuran	Not Classified	Not Classified
Tetrahydrofuran	2	720
Toluene	2	890
Triethylamine	Not Classified	Not Classified

Table 1 Residual solvents analyzed

結果

高純度 GC ヘッドスペースグレードの DMA と一般グレード（高純度）の DMA の比較により、GC ヘッドスペースグレードが優れた品質であることがわかります。**Figure 1** は GC ヘッドスペースグレードの DMA のほうがよりきれいで、妨害する可能性のあるピークがないことを示しています。

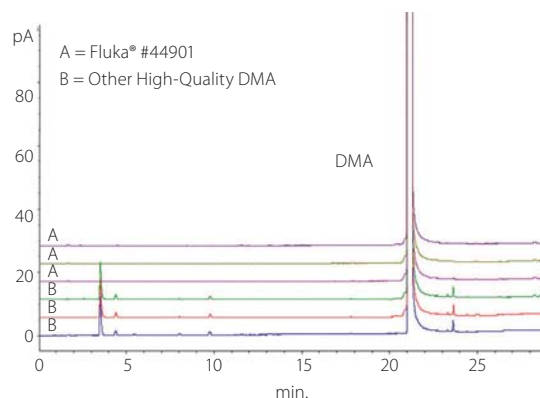



Figure 1 DMA comparison: headspace grade vs synthetic grade

ブランク溶液と各種残留溶媒を含む標準溶液の比較、および GC ヘッドスペースグレードの DMA を用いてそれぞれに分析した結果を **Figure 2, 3** に示します。また、対応するクロマトグラフィーとヘッドスペースの条件を **Figure 2, 3** に示します。

Chromatography

Headspace Parameters		
Temperatures:	Oven	90 °C
	Loop	105 °C
	Transfer Line	110 °C
Times:	Vial Equilibration	15 min
	Pressurization	0.2 min
	Loop Fill	0.2 min
	Loop Equilibration	0.05 min
Pressures:	Vial	14 psi
Loop Volume		1.0 mL
Inject Time		0.5 min
GC Parameters		
Column	Equivalent to USP G43 phase, 105 m x 0.32 mm I.D. x 1.5 µm	
Injector and Detector Temperatures	250 °C, 300 °C (FID)	
Oven Program	35 °C (10 min.), 3 °C/min. to 65 °C, 20 °C/min. to 190 °C (13 min.)	
Carrier	Helium, 2.1 mL/min. (constant pressure)	
Injection	Headspace, split ratio 24.1:1	

Table 2 Example Method 1

1. Diethyl ether
2 Acetone
3. Isopropanol
4. Acetonitrile
5. Dichloromethane
6. Methyl t-butyl ether
7. n-Hexane
8. Ethyl acetate
9. n-Heptane
10. 1,4-Dioxane
11. Toluene
12. Dimethylformamide

DMA Blank

5 10 15 20 25 30 35 min

Figure 2 Example Method 1

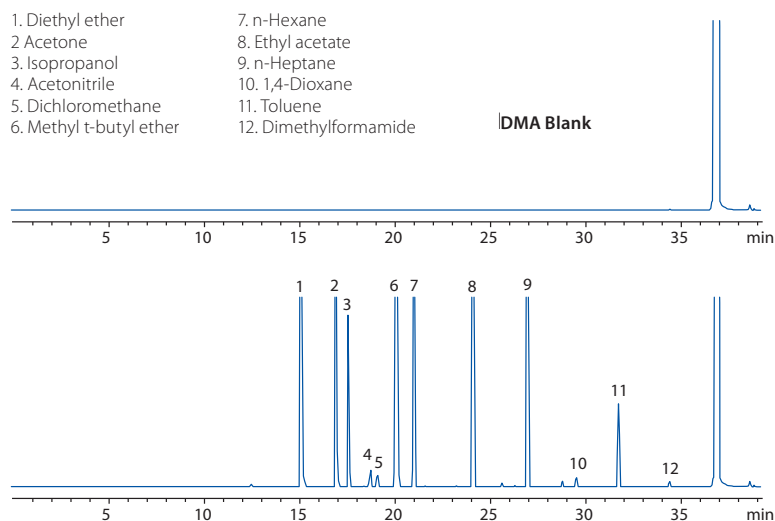
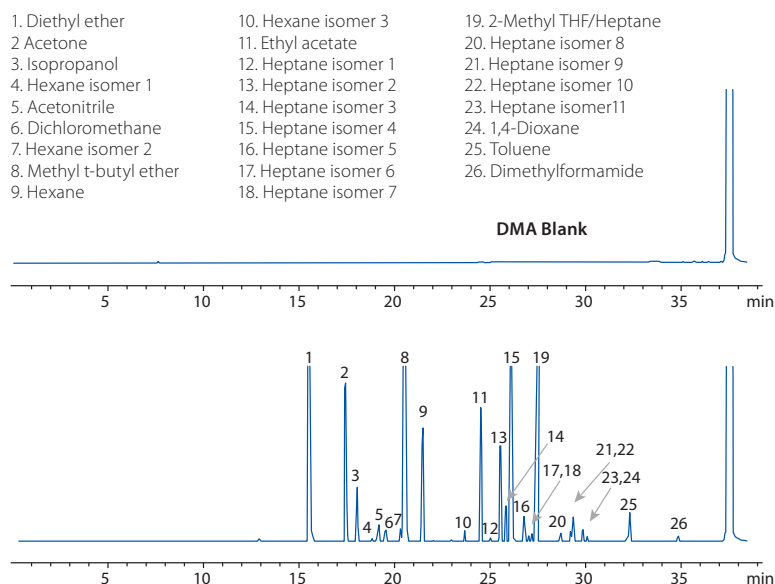
Headspace Parameters		
Temperatures:	Oven	90 °C
	Loop	105 °C
	Transfer Line	110 °C
Times:	Vial Equilibration	15 min
	Pressurization	0.2 min
	Loop Fill	0.2 min
	Loop Equilibration	0.05 min
Pressures:	Vial	14 psi
Loop Volume		1.0 mL
Inject Time		0.5 min
GC Parameters		
Column	Equivalent to USP G43 phase, 105 m x 0.32 mm I.D. x 1.5 µm	
Injector and Detector Temperatures	250 °C, 300 °C (FID)	
Oven Program	35 °C (10 min.), 3 °C/min. to 65 °C, 20 °C/min. to 190 °C (12 min.)	
Carrier	Helium, 2.1 mL/min. (constant pressure)	
Injection	Headspace, split ratio 24.1:1	

Table 3 Example Method 2

Figure 3 Example Method 2

それぞれのケースで、この方法は初期医薬品有効成分 API の残留溶媒分析に用いられました。GC-HS グレードの DMA ブランククロマトグラムはきれいで妨害ピークが無く、各残留溶媒の含有量は簡単に求めることができました。特に、反応の低い溶媒や ICH の上限が低いクラスの溶媒も高純度 DMA とのバックグラウンド妨害もなく検出されました。

- このデータは、GC ヘッドスペースグレード溶媒（DMA）の優れた性能を示しています。

- 結論として、GC ヘッドスペースグレード溶媒（DMA）は各種の残留溶媒の GC 測定を精度よく測定できることが示されました。

各ケースで、ターゲット化合物の検出を妨害する可能性のあるDMA 溶媒由来の妨害ピークはありませんでした。

References

[1] United States Pharmacopoeia (USP), 31st Edition (2008), <467> Residual Solvents.

[2] ICH Guidelines for Industry, Q3C Impurities: Residual Solvents, US Dept. of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), ICH December, 1997.

MALDI-MS 用の次世代イオン性液体マトリックス（ILMs）

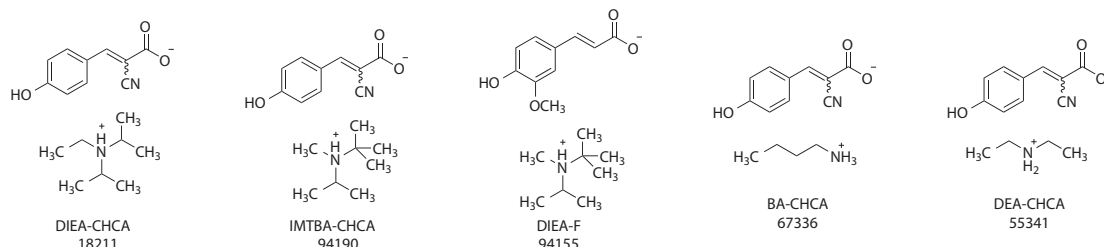
Matthias Drexler, Product Manager, Analytical Reagents matthias.drexler@sial.com

融点が 100℃未満である塩は一般にイオン性液体と呼ばれます。その独特な特性から、過去 20 ～ 30 年にわたってイオン性液体は注目され、特長を生かして様々な用途に利用されてきました。例えば、有機反応や均一触媒作用のための溶媒、液ー液抽出操作、イオン対試薬、そしてガスクロマトグラフィーの固定相としての利用があります。

2001 年、Armstrong らはマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry）において、イオン性液体は MALDI マトリックスとしても使用できることを初めて実証しました [1]。これらイオン性液体マトリックス（ILMs）は従来の固体マトリックスに勝る利点があり、最も重要な点は試料の均一性の向上、より高いレーザーパルスの再現性、MALDI 分析の定量性の向上です。試料プレート上の「ホットスポット」の確認に要する時間が減少し、より自動的な分析が可能となります。ILMs のその他の利点としては、蒸気圧が非常に低いこと、トリフルオロ酢酸のような酸の添加が必要でないため試料調製がより簡単になったなどが挙げられます。

一般的に ILMs のアニオン性の部分は α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（CHCA）またはフェルラ酸などの従来型の MALDI マトリックス物質がベースで、カチオン性部分は一般的にイオン性液体に用いられるアンモニウムまたはイミダゾリウムの一部分で構成されています。あるクラスの分析対象物の特性や適合性を向上させるために、ILMs の両方のイオン性部分を変えることができます。Armstrong らは 2009 年に次世代マトリックス、N,N-ジイソプロピルエチルアンモニウム 4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸（DIEA-F, Fluka® 94155）が糖質（炭水化物）の分析に特に適していることを示しましたが、一方 *N,N*-ジイソプロピルエチルアンモニウム α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（DIEA-CHCA, Fluka 18211）と N-tert-ブチル-N-イソプロピル-N-メチルアンモニウム a-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（IMTBA-CHCA, Fluka 94190）はかなり広い質量範囲 1,000 ～ 270,000 Da のタンパク質およびペプチドの試料の分析に特に適していることを証明しています [2, 3]。前世代の ILMs（例：BA-CHCA および DEA-CHCA）と比較して、分析対象物のシグナル強度においてこれら新しいマトリックスの方が優れています。

概して ILMs の開発は MALDI-MS 分析のための有用なツールであり、成功のカギは分析対象物に適したマトリックスを選択することと言えます。

DIEA-CHCA 18211 | IMTBA-CHCA 94190 | DIEA-F 94155 | BA-CHCA 67336 | DEA-CHCA 55341

Cat. No.	Brand	Description	Abbrev.	Gen.	Suitable for	Package Sizes
18211	Fluka	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid N-ethyl-N,N-diisopropylammonium salt	DIEA-CHCA	2nd	Peptides, proteins, biodegradable polymers	10 x 10 mg
94190	Fluka	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid N-tert-butyl-N-isopropyl-N-methylammonium salt	IMTBA-CHCA	2nd	Peptides, proteins	10 x 10 mg
94155	Fluka	Ferulic acid N-ethyl-N,N-diisopropylammonium salt	DIEA-F	2nd	Carbohydrates	10 x 10 mg
67336	Fluka	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid butylamine salt	BA-CHCA	1st	Peptides, proteins, polymers	100 mg, 1 g
55341	Fluka	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid diethylammonium salt	DEA-CHCA	1st	Peptides, proteins, polymers	1 g

Product Table Ionic liquid matrices (ILMs) for MALDI-MS. Please find the complete product list at **sigma-aldrich.com/maldi**

References

[1] D. W. Armstrong, L. Zhang, L. He, M. L. Gross, Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 2001, 73, 3679 – 3686.

[2] A. Berthod, J. A. Crank, K. L. Rundlett, D. W. Armstrong, A Second-Generation Ionic Liquid Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrix for Effective Mass Spectrometric Analysis of Biodegradable Polymers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 3409 – 3422.

[3] J. A. Crank, D. W. Armstrong, Towards a Second Generation of Ionic Liquid Matrices (ILMs) for MALDI-MS of Peptides, Proteins, and Carbohydrates, *J. Am. Chem.* Soc. 2009, 20, 1790 – 1800.

カールフィッシャー(KF)水分測定のシステムチェック用 HYDRANAL®-水・標準品

Andrea Felgner, Market Segment Manager HYDRANAL andrea.felgner@sial.com

ほとんどの品質管理システムにおいて、分析機器と試薬のキャリブレーション、バリデーションおよびコントロールは要求事項の中心となります。カールフィッシャー(KF)測定の場合、水分計のバリデーションおよび検査に加えて、力価測定、測定精度のコントロールが重要な役割を果たします。

電量滴定法で許容される標準偏差の推奨値は次のとおりです。

- 水 1,000 μg ± 30 μg
- 水 100 μg ± 10 μg

以下の目的に HYDRANAL-水・標準品の使用をお勧めします。

- 力価測定
- 測定精度の確認
- ISO9001-9003、GMP、GLP および FDA ガイドラインに従った KF 水分計のバリデーションと検査

カールフィッシャー容量滴定法における力価測定

容量滴定法では、滴定液の測定(すなわち力価)および一定のコントロールが必要です。KF 反応機構はよく知られており、数多くの分野に利用されていますが、正確で信頼性のある測定値を得るためには、時間をかけて正確な力価を測定する必要があります。

滴定液の力価は、既知の量の水を含む、規定された量の物質を測定して求めます。この物質は純水か、または水分量が正確にコントロールされた物質です。純水を使用する際には取り扱い、および秤量を厳密に行う必要があります。力価 2 の滴定液では 1 回の測定時の注入量は純水 10 ～ 15 mg しか必要とされません。このように微量の水分を扱う際、秤量誤差が簡単に発生する可能性があります。誤差によって標準偏差は大きくなり、力価にバラツキが生じます。ところが、水分含有量の低い物質を用いると、標準偏差は小さくなり、精度が著しく向上します。容量滴定法で許容される標準偏差の推奨値は、水 10.0 mg ± 0.2 mg です。

電量滴定用水分計のシステムチェック

電量滴定法は絶対量の水分定量法と考えられていますが、測定結果が必ずしも正しいとは限りません。空気中の湿度、電極の被覆、または試料マトリックスの条件によって測定値が影響を受ける可能性があります。このため、水分既知量の物質を用いてシステムチェックを行って水分回収率を確認することが必要です。システムチェックは、滴定セルの試薬を新しく交換した後に行います。試料マトリックスによる影響を確認するためには、実試料分析直後に速やかに行います。理論上の水分量と実際に加えた水分量は一致している必要があります。

液体タイプの HYDRANAL-水・標準品

液体タイプの HYDRANAL-水・標準品は容量滴定法、電量滴定法の水分測定に理想的な標準物質です。標準物質は安定した溶剤の特殊組成の混合物で、正確な水分値を有しており、開封した時の品質を確保するために密閉性のガラス製アンプルに充填されています。正確な水分値は試験成績書(CoA)に明記され、各製品パッケージに同梱されています。また、液体タイプの HYDRANAL-水・標準品はアルゴン雰囲気下で 4 mL または 8 mL のガラス製アンプルに充填されていますので、少なくとも 5 年間の品質保証期限が設定されています。各製品はアンプルが 10 本入りです。

国家規格または国際単位系(SI)へのトレーサビリティーはガイドラインによってしばしば要求されます。当社の HYDRANAL-水・標準品は NIST standard reference material SRM 2890, Water Saturated Octanol (NIST—National Institute of Standards and Technology USA) を用いて試験しています。

ISO760 では、KF 滴定液の力価測定に純水ではなく酒石酸ナトリウム二水和物を用いるよう規定しています。HYDRANAL-標準酒石酸ナトリウム二水和物はこの用途に理想的です。この製品は水分値が 15.66wt(重量)%(CoA に正確な水分値が明記されています)ですが、この値は 150℃で乾燥させた際の値です。酒石酸ナトリウム二水和物はメタノールには難溶性ですが、HYDRANAL ソルベントにはよく溶解します。

Product Table HYDRANAL® Standard Substances for KF Titration

Cat. No.	Brand	Description
Liquid Standards		
34849	Fluka®	**HYDRANAL-Water Standard 10.0** Liquid standard for volumetric KF titer determination. Water content 10.0 mg/g (1.0%), exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890 and traceable to SI-Unit (kg).
34828	Fluka	**HYDRANAL-Water Standard 1.0** Liquid standard for coulometric KF titration. Water content 1.0 mg/g (0.1%), exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890. Used for validation and check of system and recovery rates.
34847	Fluka	**HYDRANAL-Water Standard 0.1** Liquid standard for coulometric KF titration. Water content 0.1 mg/g (0.01%), exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890. Used for validation and check of system and recovery rates.
34813	Fluka	**HYDRANAL-Standard 5.0** Liquid standard for volumetric KF titration. Water content 5.00 ± 0.02 mg/mL (5.91 ± 0.02 mg/g).
34694	Fluka	**HYDRANAL-Water Standard Oil** Mineral oil-based matrix standard, for direct coulometric and volumetric KF titration and indirect titration with KF oven. Water content in the low ppm range, exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890.
Solid Standards		
34696	Fluka	**HYDRANAL-Standard sodium tartrate dihydrate** Primary standard reference material for volumetric KF titration. Water content ~15.66%, exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890 and traceable to SI-Unit (kg). This standard remains stable under normal conditions and does not lose or absorb moisture. This product is a finely powdered solid that dissolves relatively quickly; although its solubility in methanol is limited.
34693	Fluka	**HYDRANAL-Water Standard KF-Oven 140–160 °C** Solid standard for the control of KF oven using the coulometric or volumetric technique. Water content ~5%, exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890. This standard can be used to verify accuracy of results and tightness of a KF oven system. The function of the connected titration cell should be tested using a liquid HYDRANAL-Water Standard.
34748	Fluka	**HYDRANAL-Water Standard KF-Oven 220–230 °C** Solid standard for the control of KF oven, using the coulometric or volumetric technique. Water content 5.55 ± 0.05%, exact value stated on CoA. Tested against NIST SRM 2890. This standard can be used to verify accuracy of results and tightness of a KF oven system. The function of the connected titration cell should be tested using a liquid HYDRANAL-Water Standard.

液体タイプの HYDRANAL- 水・標準品の利点：

- アルゴン雰囲気下でガラス製アンプルに封入
- 一連の試験に 1 アンプルで充分
- 少なくとも 5 年間の品質保証期限
- 取扱説明書の添付（英語版）
- 試験成績書が製品に同梱
- 全ての HYDRANAL- 水・標準品は NIST SRM 2890 を用いて検査済み

- 本記載の製品及び情報は2013年11月1日現在の情報であり、収載の品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。
  最新の情報は、弊社Web サイト（sigma-aldrich.com/japan）をご覧下さい。
- 掲載価格は希望納入価格（税別）です。詳細は販売代理店様へご確認下さい。
- 弊社の試薬は試験研究用のみを目的として販売しております。医薬品並びに工業用原料等としてご購入の際は、弊社ファインケミカル事業部までお問い合わせ願います。

SIGMA-ALDRICH®

シグマ アルドリッチ ジャパン

〒140-0002 東京都品川区東品川2-2-24 天王洲セントラルタワー4階
製品に関するお問い合わせは、弊社アナリティカル製品グループへ
TEL:03-5796-7440 FAX:03-5796-7355
E-mail：sialjpsp@sial.com
在庫照会･ご注文方法に関するお問い合わせは、弊社カスタマーサービスへ
TEL:03-5796-7320 FAX:03-5796-7325
E-mail:sialjpcs@sial.com
大阪営業所:〒532-0004 大阪市淀川区西宮原2-7-38 新大阪西浦ビル
TEL:06-6397-5963 FAX:06-6397-4649
http//www.sigma-aldrich.com/japan

お問い合わせは下記代理店へ

SAJ1634 2013.11